



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

INFECÇÃO CITOMEGÁLICA: COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE MONITORIZAÇÃO EM TRANSPLANTADOS CARDÍACOS E RENAIS

Trabalho submetido por
Carolina Jesus Dias
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2017



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

INFECÇÃO CITOMEGÁLICA: COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE MONITORIZAÇÃO EM TRANSPLANTADOS CARDÍACOS E RENAIS

Trabalho submetido por
Carolina Jesus Dias
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Perpétua Gomes

e coorientado por
Prof. Doutor Paulo Paixão

novembro de 2017

Agradecimentos

Gostaria de demonstrar o meu profundo agradecimento à Professora Doutora Perpétua Gomes, por todo o apoio, paciência, disponibilidade e orientação ao longo da realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Paulo Paixão, por toda a disponibilidade, amabilidade e conhecimento que foi fundamental para a realização desta dissertação.

À equipa técnica do laboratório de microbiologia do Hospital Egas Moniz e aos membros do departamento de microbiologia da Nova Medical School/Faculdade de Ciências Médicas, por todo o empenho e disponibilidade para obtenção de dados, sem os quais, não seria possível a realização deste trabalho.

À Professora Alexandra Figueiredo e à Doutora Ana Paula Silva, pela colaboração no tratamento estatístico dos dados.

Aos meus colegas da Egas Moniz, pelo companheirismo.

Aos meus pais, Filipe e Suzel, e irmão, Duarte, pelo apoio e amor incondicional.

Aos meus avós, Chico e Benedita, por todo o carinho e preocupação.

Ao meu companheiro, Nuno, por estar presente em todos os momentos e por toda a força e coragem transmitida.

Aos amigos de sempre, pelos bons momentos.

A TODOS o meu sincero Obrigado!

Resumo

O Citomegalovírus permanece como uma das maiores causas de morbidade e mortalidade entre os recetores de transplante de órgão sólido (SOT), apesar dos notáveis progressos no seu diagnóstico, prevenção e tratamento. Atualmente são utilizadas duas metodologias na monitorização da infeção e doença por CMV nestes doentes: o método da antigenémia para deteção do antígeno pp65 e o teste quantitativo de deteção de ácidos nucleicos (QNAT). Este estudo propõe-se a comparar dois QNAT diferentes (o teste Roche COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan CMV, comercialmente disponível, e um teste RT-PCR *in house*) e uma técnica de antigenémia pp65. Um total de 49 amostras provenientes de 32 recetores de transplante (28 transplantados renais e 4 transplantados cardíacos) foram submetidas a estas três metodologias. Os resultados revelaram uma concordância estatisticamente significativa (níveis de concordância entre 81,6 e 71,4% e valores de coeficiente Cohen's kappa entre 0,456 e 0,602 com um nível de significância $< 0,001$) e uma correlação moderada a elevada ($P < 0,01$) entre estes métodos (valor de coeficiente de Spearman de 0,769 para a comparação entre a antigenémia e o COBAS, 0,546 entre a antigenémia e a RT-PCR *in house* e 0,736 entre o COBAS e a RT-PCR *in house*). Os notáveis e inesperados resultados obtidos pelo teste da antigenémia refletem as décadas de experiência que o laboratório de microbiologia do Hospital Egas Moniz e o operador têm com esta técnica, dado a sua interpretação ser subjetiva e dependente da experiência de quem está a efetuar o teste. Adicionalmente foi possível observar que um terço (33,3%) de todas as amostras positivas para antigenémia tinham contagens de 1 ou 2 células positivas. Os resultados deste estudo revelaram concordância e correlação entre as três técnicas, concluindo-se assim que estas podem ser utilizadas com sucesso na monitorização de doentes sujeitos a SOT.

Palavras-chave: Citomegalovírus; transplante; antigenémia; QNAT.

Abstract

Cytomegalovirus remains a major cause of morbidity and mortality among solid organ transplant recipients, despite remarkable advances in its diagnosis, prevention and treatment. Currently two methodologies are used to monitor CMV infection and disease in these patients: pp65 antigenemia assay and quantitative nucleic acid test (QNAT). The propose of this study is to compare two different QNAT (one commercially available, Roche COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan CMV test and another laboratory-developed RT-PCR test) and one CMV pp65 antigenemia assay. A total of 49 samples from 32 transplant recipients (28 renal and 4 cardiac transplants) were submitted to these three methodologies. The results show a statistically significant agreement (concordance rates between 81,6 and 71,4% and Cohen's kappa coefficient values between 0,456 and 0,602 with a level of significance $< 0,001$) and a moderate to high significant ($P < 0,01$) correlation between these methods (Spearman's coefficient value of 0,769 for pp65 antigenemia and COBAS, 0,546 for pp65 antigenemia and RT-PCR "in house" and 0,736 for COBAS and RT-PCR "in house" comparison). The remarkable and unexpected results obtained by the antigenemia test reflects the decades of experience in this technique by the microbiology laboratory of Egas Moniz Hospital and the operator, since that the interpretation of this test is subjective and depends on the expertise of the person performing the test. Additionally, one third (33,3%) of all antigenemia positive samples have 1 or 2 positive cells. The results from this study show an agreement and a correlation between the three methodologies, therefore we conclude that these can be used successfully for after solid organ transplant recipients monitoring.

Keywords: Cytomegalovirus; transplant; antigenemia; QNAT.

Índice Geral

1. Introdução.....	15
2. Infecção Citomegálica.....	17
2.1 CMV	17
2.2 História	17
2.3 Estrutura.....	18
2.4 Ciclo de replicação viral	20
2.5 Epidemiologia.....	21
2.6 Vias de transmissão	22
2.7 Patogénese e Resposta Imunitária	24
2.8 Definições: Infecção vs. Doença Citomegálica.....	27
2.9 Infecção primária, Infecção latente e Infecções recorrentes	28
2.10 Infecção citomegálica nos diversos hospedeiros	30
2.10.1 Indivíduo imunocompetente	30
2.10.2 Grupos de risco na infecção por citomegalovírus.....	31
2.10.2.1 Infecção congénita e perinatal.....	31
2.10.2.2 Indivíduo imunocomprometido	33
I Hospedeiro VIH-positivo.....	33
II Hospedeiro submetido a transplante	34
II.a HSCT	36
II.b SOT.....	38
II.c Diagnóstico nos doentes transplantados.....	40
2.11 Métodos de diagnóstico e monitorização laboratorial	41
2.11.1 Serologia	42
2.11.2 Método de deteção de ácidos nucleicos	43
2.11.3 Antigenemia	46
2.11.4 Cultura de células.....	47
2.11.5 Histopatologia	48
2.12 Terapêutica antiviral para o CMV	49
2.12.1 Tratamento	49
2.12.1.1 Tratamento no indivíduo transplantado.....	49
2.12.2 Prevenção (profilaxia antiviral e tratamento <i>preemptivo</i>).....	49
2.12.2.1 Profilaxia Antiviral.....	50

2.12.2.2	Tratamento <i>preemptivo</i>	50
2.13	Resistência Viral.....	51
2.14	Referências Bibliográficas.....	53
3.	Cytomegalovirus Infection: Comparison of methodologies for monitoring renal and cardiac transplants	75
3.1	Abstract.....	75
3.2	Introduction.....	76
3.3	Objective.....	78
3.4	Materials and methods.....	78
3.4.1	Patients and clinical specimens.....	78
3.4.2	Quantitative CMV RT-PCR commercially available	79
3.4.3	Quantitative CMV RT-PCR “in-house”	80
3.4.4	CMV pp65 antigenemia assay	81
3.4.5	Statistical analysis	81
3.5	Results.....	82
3.5.1	Qualitative results of the CMV pp65 antigenemia assay vs. CMV RT-PCR commercially available assay.....	82
3.5.2	Qualitative results of the CMV pp65 antigenemia vs. CMV RT-PCR “in-house” assays	83
3.5.3	Qualitative results of the CMV RT-PCR commercially available vs. CMV RT-PCR “in-house” assays	84
3.5.4	Quantitative results of the CMV pp65 antigenemia assay vs. CMV RT-PCR commercially available assays	85
3.5.5	Quantitative results of the CMV pp65 antigenemia assay vs. CMV RT-PCR “in-house” assays	86
3.5.6	Quantitative results of the CMV RT-PCR commercially available vs. CMV RT-PCR “in-house” assays	86
3.6	Discussion and Conclusion.....	87
3.7	Acknowledgements.....	89
3.8	References.....	89
4.	Anexos	93
	Anexo I – Resultados obtidos nas 3 técnicas (Teste de Antigenémia, Teste COBAS e Teste RT-PCR “in house”) por doente.	93

Índice de Figuras

Figura 1 Correlation between pp65 antigenemia assay and COBAS test in 30 samples. The linear regression is showed in solid line.....	85
Figura 2 Correlation between pp65 antigenemia assay and RT-PCR “in house” method in 32 samples. The linear regression is showed in solid line.....	86
Figura 3 Correlation between COBAS test and RT-PCR method in 40 samples. The linear regression is showed in solid line.	87

Índice de Tabelas

Tabela 1 Comparison between pp65 antigenemia assay and COBAS test.....	83
Tabela 2 Comparison between pp65 antigenemia assay and RT-PCR “in house” method.	84
Tabela 3 Comparison between COBAS test and RT-PCR “in house” method.	85

Lista de Acrónimos

AC - *Assembly complex*

ADN - *Ácido desoxirribonucleico*

APCs - *Antigen Presenting Cells*

ARN - *Ácido ribonucleico*

ARNm - *ARN mensageiro*

cAMP - *Cyclic adenosine monophosphate*

CID - *Cytomegalic Inclusion Disease*

CMV - *Citomegalovirus*

CMVH - *Citomegalovirus Humano*

DEVH - *Doença do enxerto-versus-hospedeiro*

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

dNTP - *Deoxynucleotide triphosphates*

EBV - *Epstein-Barr virus*

EDTA - *Ethylenediaminetetraacetic acid*

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FITC - *Fluorescein isothiocyanate*

GVHD - *Graft-versus-host disease*

HAART - *Highly Active Antiretroviral Therapy*

HCMV - *Human Cytomegalovirus*

HLA - *Human Leukocyte Antigen*

HSCT - *Hematopoietic Stem Cell Transplant*

HSV-6 - *Herpesvírus humano 6*

HSV-7 - *Herpesvírus humano 7*

IFN- α/β - *Interferon alpha/beta*

IFN γ - *Interferon gamma*

IgG - *Imunoglobulina da classe G*

IgM - *Imunoglobulina da classe M*

IRL - *Internal repeat long*

IRS - *Internal repeat short*

LDTs - *Laboratory-developed tests*

mC-BP - *mCP binding protein*

MCP - *Major capsid protein*

mCP - *Minor capsid protein*

MGB - *Minor groove binding*

MHC - *Major Histocompatibility Complex*

miARNs - *microARNs*

MIEP - *Major immediate early promote*

NAT - *Nucleic Acid Testing*

NF- κ B - *Factor nuclear kappa B*

NK - *Natural Killer*

OMS - *Organização Mundial da Saúde*

ORFs - *Open reading frames*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PRRs - *Pattern recognition receptors*

QNAT - *Quantitative nucleic acid test*

QS - *Quantitative Standard*

RNA - *Ribonucleic acid*

RT-PCR - *Real time-PCR*

SCP - *Smallest capsid protein*

SIDA - *Síndrome da imunodeficiência adquirida*

SOT - *Solid Organ Transplant*

TARc - *Terapêutica antirretroviral combinada*

Tc - *T cytotoxic cell*

Th - *T helper cell*

TLR - *Toll-like receptors*

TNF- α - *Tumor necrosis factor alpha*

TRL - *Terminal repeat long*

TRS - *Terminal repeat short*

UL - *Unique long sequence*

US - *Unique short sequence*

VIH - *Vírus da imunodeficiência Humana*

WHO - *World Health Organization*

1. Introdução

O Citomegalovírus Humano (*Human betaherpesvirus 5*) é um vírus ubíquo, pertencente à família *Herpesviridae*, que foi pela primeira vez isolado nos anos 50, por Margaret Smith.

A infecção por CMV (Citomegalovírus) é endêmica, apresentando uma seroprevalência na população mundial adulta que varia entre 30 e 100 %.

Aquando do primeiro contacto deste vírus com um hospedeiro imunocompetente, surge a infecção primária, a qual se revela na maioria das vezes assintomática, podendo em 10% dos casos causar uma doença benigna e autolimitada designada de síndrome mononucleósica. Sendo um herpesvírus, após a infecção primária estabelece uma infecção latente a qual pode sofrer, esporadicamente, episódios de reativação, os quais não são habitualmente detetados no indivíduo saudável.

Ao inverso do que sucede no indivíduo imunocompetente, no hospedeiro imunocomprometido (indivíduos VIH [Vírus da Imunodeficiência Humana] positivo e transplantados) e subdesenvolvido (fetos e recém-nascidos) a infecção citomegálica é uma importante causa de morbilidade e mortalidade.

Nas últimas décadas, o reconhecimento da importância clínica do CMV nestes grupos de risco, levou a um grande desenvolvimento dos métodos de diagnóstico e monitorização da infecção por este vírus (serologia, métodos de deteção de ácidos nucleicos, antigenémia, cultura de células e histopatologia), onde se destaca a transição, inicial, da utilização de métodos laboratórios baseados em cultura de células para técnicas de antigenémia e, posteriormente, desta última para metodologias de deteção de ácidos nucleicos.

A presente dissertação tem como principal objetivo a avaliação das metodologias de monitorização utilizadas no contexto do indivíduo sujeito a transplante de órgão sólido, com destaque para o transplante cardíaco e renal. Para tal é feita, inicialmente, uma revisão bibliográfica sobre o CMV, abordando com mais pormenor a infecção e doença citomegálica em doentes transplantados e as metodologias de diagnóstico e monitorização deste vírus, de modo a contextualizar a temática. De seguida, é apresentado em formato de artigo científico a investigação de campo desenvolvida com o intuito de comparar três

técnicas de monitorização de transplantados cardíacos e renais (teste de antigenémia para deteção do antígeno viral pp65, teste Roche COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan CMV e uma técnica “*in-house*” de RT-PCR).

Para composição da primeira secção desta dissertação (revisão bibliográfica: Infeção Citomegálica) recorreu-se a literatura científica presente em bases de dados *online*, como são, o PubMed, o ScienceDirect, o Google Scholar, o SpringerLink e o PLOS. No final desta secção são apresentadas as referências bibliográficas correspondentes a esta revisão bibliográfica. Para elaboração da segunda secção (proposta de artigo: Comparação de metodologias de monitorização em transplantados cardíacos e renais) foi visualizada a realização das três técnicas (o teste COBAS e o teste de antigenémia pp65 no laboratório de microbiologia do Hospital Egas Moniz e a técnica “*in house*” de RT-PCR no laboratório de microbiologia da Nova Medical School/Faculdade de Ciências Médicas) e posteriormente foram recolhidos os resultados, provenientes da análise de 49 amostras de 32 doentes transplantados (28 transplantados renais e 4 transplantados cardíacos) do Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, dos 3 testes mencionados acima. Tendo sido, a partir destes resultados, construída uma base de dados, a qual foi utilizada para a elaboração da proposta de artigo aqui apresentado. No final desta secção são apresentadas as referências bibliográficas correspondentes à proposta de artigo, desta forma este está pronto para submissão ao *Journal of Clinical Virology*.

2. Infeção Citomegálica

2.1 CMV

O Citomegalovírus humano (em inglês, *Human Cytomegalovirus*, HCMV), também conhecido como *Human betaherpesvirus 5*, é um vírus ubíquo, que pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae* e ao género *Cytomegalovirus* (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2016). Foi isolado pela primeira vez nos anos 50, a partir de uma glândula salivar humana e é atualmente um dos maiores vírus humanos conhecidos (Ramanan & Razonable, 2013).

2.2 História

Os efeitos do Citomegalovírus humano foram observados pela primeira vez, no ano de 1881, por Hugo Ribbert, patologista alemão. Este visualizou células de grandes dimensões, contendo inclusões intranucleares, nos rins de um nado-morto por sífilis e na glândula parótida de crianças. Em 1904, A. Jesionek e B. Kiolemenoglou descreveram células pulmonares, renais e hepáticas com aspeto morfológico semelhante, num nado-morto de 8 meses, como estando relacionadas com protozoários. Três anos mais tarde, C. Løwenstein, descobriu células similares nas glândulas parótidas de quatro crianças (Ho, 2008; Makker, Bajantri, Sakam & Chilimuri, 2016).

Em 1921, foram observados, por E. Goodpasture e F. Talbot, em células infetadas com o vírus da Varicela-Zoster, e por B. Lipschuetz, em células infetadas com o vírus *Herpes simplex*, inclusões intranucleares à semelhança das infetadas pelos "protozoários". Em 1925, W.C. VonGlahn e A.M. Pappenheimer, tendo por base estas descobertas, colocaram a hipótese das alterações celulares descritas por Ribbert, serem produzidas por vírus e não por protozoários. Estes foram os primeiros indícios de que todos estes vírus pertencem à mesma família, posteriormente denominada de *Herpesviridae* (Ho, 2008; Makker et al., 2016).

Em 1932, S. Farber e S. Wolbach detetaram um grande número de células contendo inclusões intranucleares nas glândulas salivares, de 26 crianças autopsiadas de um grupo de 183, hoje é sabido que este representa um local major de replicação e transmissão do vírus. Perante esta descoberta surgiu o termo "vírus da glândula salivar".

No mesmo ano, estas células foram detetadas em 25 casos letais de infeção congénita, que se caracterizava pela presença de petéquias, hepatoesplenomegalia e calcificações intracerebrais. Considerando este quadro clínico, J.P. Wyatt e a sua equipa, em 1950, sugeriram o nome de Doença Generalizada de Inclusões Citomegálicas (do inglês, *Generalized Cytomegalic Inclusion Disease* - CID) (Ho, 2008).

Visto a presença de inclusões intranucleares, nas células dos túbulos renais, ser uma contante, foi possível, pela primeira vez, em 1952 por G.H. Fetterman, o diagnóstico *ante mortem* da CID, a partir de uma preparação citológica de sedimento urinário de um caso suspeito. No ano seguinte, W.H. Minder, conseguiu visualizar ao microscópio eletrónico, em células pancreáticas de um caso de CID, partículas, que sugeriam como causa desta doença, um vírus (Ho, 2008).

O vírus foi pela primeira vez isolado, em 1955, por Margaret Smith, atualmente considerada a mãe do citomegalovírus humano, a partir de glândulas salivares, em cultura de células humanas (Reddehase, 2015).

Em 1957, foi proposto por T.H. Weller, o nome “Citomegalovírus” para este agente infeccioso (Ho, 2008).

2.3 Estrutura

No que concerne à sua estrutura, o citomegalovírus, à semelhança dos restantes elementos desta família, consiste num core de genoma viral circunscrito por uma nucleocápside icosaédrica, que por sua vez está contido num invólucro de natureza glúcido-lípido-proteica, sendo que entre os últimos se encontra o tegumento (Dai et al., 2013). O diâmetro do CMVH (Citomegalovirus Humano) é de cerca de 150-200 nm, sendo portanto, considerado o maior herpesvírus (Dioverti & Razonable, 2016).

O genoma do CMVH é o maior de entre todos os herpesvírus humanos, sendo composto por ADN (ácido desoxirribonucleico) de cadeia dupla linear, com um tamanho de aproximadamente 236 000 pares de bases, contendo mais de 200 ORFs (*open reading frames*) (Chaer, Shah & Chemaly, 2016; Dolan et al., 2004; Sylwester et al., 2005). O genoma é segmentado, sendo composto por 2 sequências ou regiões diferentes, designadas curta e longa (em inglês, *long*, L; *short*, S), que se ligam covalentemente (Dolan et al., 2004). Cada sequência consiste numa zona central (em inglês, *unique long*

sequence, UL; *unique short sequence*, US) limitada por sequências repetidas invertidas. Em cada uma das extremidades do genoma encontra-se uma sequência terminal repetida, uma longa e outra curta (em inglês, *terminal repeat long*, TRL; *terminal repeat short*, TRS) que são complementares e entre as 2 zonas centrais encontram-se duas sequências repetidas invertidas internas, uma longa e outra curta (em inglês, *internal repeat long*, IRL; *internal repeat short*, IRS). Fazendo com que a configuração geral do genoma se apresente como TRL–UL–IRL–IRS–US–TRS (Davison et al., 2003; Murphy et al., 2003).

Por convenção, geralmente, os genes do CMV são designados segundo a posição que ocupam no genoma viral, ou seja, por exemplo, o gene UL54 (o gene da ADN polimerase viral) é o 54º gene na região UL do genoma do CMV (Michael Boeckh & Geballe, 2011).

A nucleocápside icosaédrica é formada por 162 capsómeros e tem na sua composição 4 proteínas major: a proteína major da cápsula (em inglês, *major capsid protein*, MCP), a proteína minor da cápsula (em inglês, *minor capsid protein*, mCP) a proteína de ligação à mCP (em inglês, *mCP binding protein*, mC-BP) e a proteína mais pequena da cápsula (em inglês, *smallest capsid protein*, SCP) (Butcher, Aitken, Mitchell, Gowen & Dargan, 1998; Dai et al., 2013).

O tegumento é uma matriz proteica que contém a maior parte das proteínas do virião, cerca de 38 proteínas, sendo estas fosforiladas (Smith, Kosuri, & Kerry, 2014). São 5 as proteínas major do tegumento, designadamente, a fosfoproteína 65 (pp65 ou *unique long* 83, UL83, a proteína mais abundante no tegumento), a fosfoproteína 71 (pp71 ou UL82), a fosfoproteína 150 (pp150 ou UL32, a segunda proteína mais abundante no tegumento), a maior proteína do tegumento (UL48) e a fosfoproteína 28 (pp28 ou UL99). Para além destas, é possível encontrar no tegumento outras proteínas em menores quantidades e ainda ARN (ácido ribonucleico) viral e celular (Crough & Khanna, 2009; Kalejta, 2008). As proteínas do tegumento desempenham importantes funções ao longo de todo o ciclo de vida do vírus, incluindo, ao nível da internalização viral, expressão de genes, evasão do sistema imunitário, montagem das novas partículas virais e libertação do virião da célula infetada (Tomtishen III, 2012).

O invólucro viral tem aproximadamente 10 nm de espessura e é composto por

uma bicamada lipídica, que contém diferentes tipos de glicoproteínas virais (destacando-se as glicoproteínas gB, gM, gN, gH, gO e gL, que formam 3 complexos de glicoproteínas, gCI [gB], gCII [gM/gN], gCIII [gH/gL/gO]), as quais desempenham importantes funções de adesão e entrada do vírus nas células do hospedeiro (Coleman, Hornig, Maddux, Choi & McGregor, 2015).

2.4 Ciclo de replicação viral

O CMVH pode entrar na célula humana através de 2 vias, por fusão com a membrana celular ou por endocitose (Wang, Yu, Schröer, Murphy & Shenk, 2007). De forma a ocorrer a internalização viral é necessária a interação das glicoproteínas do invólucro do vírus (nomeadamente, gB, gH e gL) com recetores celulares específicos (tais como, o fator de crescimento α derivado de plaquetas e integrinas) seguida da fusão do invólucro viral com a membrana celular, libertando assim a nucleocápside e as proteínas do tegumento no citosol da célula hospedeira. A via endocítica, dependente de pH baixo, é mediada por glicoproteínas do invólucro viral e é dependente dos genes UL128, UL130 e UL131A (Michael Boeckh & Geballe, 2011; Crough & Khanna, 2009; Soroceanu, Akhavan & Cobbs, 2008). Esta está implicada na infeção de células endoteliais e epiteliais, células do músculo liso e fibroblastos, sendo importante na persistência, disseminação do vírus e progressão da doença por CMV (Ryckman, Jarvis, Drummond, Nelson & Johnson, 2006).

Após internalização viral, algumas proteínas do tegumento, nomeadamente UL47 e UL48 (e possivelmente a proteína pp150), associam-se à nucleocápside e medeiam o seu transporte ao longo dos microtúbulos do citoplasma celular até à membrana nuclear. Aqui a nucleocápside dissocia-se dos microtúbulos e dispõe-se entre um poro nuclear, onde o genoma viral é libertado para o núcleo. Das restantes proteínas do tegumento, parte migra de forma independente para o núcleo (nomeadamente, pp65 e pp71) e outra parte permanece no citoplasma (Kalejta, 2008).

Uma vez no núcleo, o genoma viral é circularizado e dá-se início à transcrição e tradução de genes que compreende 3 fases sequenciais. Numa primeira fase são transcritos os genes imediatamente precoces ou α -genes que dão origem às proteínas imediatamente precoces (proteínas não estruturais). Estas são necessárias à expressão dos genes subsequentes, genes precoces ou β -genes, que por sua vez vão originar proteínas

precoces (proteínas não estruturais), fundamentalmente enzimas essenciais à replicação, nomeadamente, ADN polimerase, dando assim início à replicação do genoma viral. Numa terceira fase, posterior à replicação, tem início a transcrição dos genes tardios ou γ -genes, que originam proteínas tardias (proteínas estruturais) que são constituintes da nucleocápside e do invólucro viral (Chambers et al., 1999).

Esta etapa de transcrição viral, e consequentemente as seguintes, são influenciadas pela localização celular da proteína do tegumento pp71. No caso em que esta migre para o núcleo a expressão dos genes imediatamente precoces é ativada e a infeção lítica tem início. Se, por contrário, a proteína pp71 permanece ao nível do citoplasma da célula hospedeira, a expressão dos genes imediatamente precoces é reprimida e o vírus estabelece latência (Kalejta, 2008).

A expressão dos genes tardios dá início à montagem da nucleocápside viral, com proteínas sintetizadas no citoplasma das células hospedeira que migram para o núcleo, e consequente encapsidação do ADN viral replicado anteriormente. A nucleocápside é então transportada para o citoplasma onde se associa a proteínas do tegumento e posteriormente desloca-se até uma estrutura celular única denominada de complexo de montagem (em inglês, *assembly complex*, AC), que é composta por componentes do retículo endoplasmático, do complexo de golgi e do compartimento endossomal. Aqui a nucleocápside adquire o invólucro maduro e de seguida é libertada por um processo de exocitose (eventualmente lise celular) para o exterior da célula infetada. Durante este processo de montagem e libertação das partículas virais as proteínas do tegumento pp150 e pp28 desempenham funções importantes. A primeira mantém a estabilidade e direciona a nucleocápside no citoplasma, tal como, reorganiza o citoplasma durante a montagem da partícula viral, ao passo que, a segunda é essencial na formação do invólucro viral (Jean Beltran & Cristea, 2014; Tomtishen III, 2012).

2.5 Epidemiologia

A infeção citomegálica é endémica, não tem predomínio sazonal conhecido e tem uma prevalência que varia entre 30 e 100 % na população mundial adulta, dependendo de fatores epidemiológicos, como o sexo, a idade (observam-se uma seroprevalência mais elevadas em faixas etárias superiores) a distribuição geográfica (nos países em desenvolvimento a seroprevalência é superior à dos países desenvolvidos) e o *status*

socioeconómico (em países onde o nível socioeconómico é mais precário a seroprevalência é superior e geralmente os grupos socioeconómicos mais elevados apresentam uma seroprevalência mais baixa e adquirem a infeção mais tarde). Outros fatores que estão diretamente associados a uma superior seroprevalência incluem, populações não caucasianas, cuidar de crianças pequenas, atividade sexual ativa, locais com concentração muito elevada de pessoas e indivíduos do género feminino (Cannon, Schmid & Hyde, 2010; Feng et al., 2016; Marsico & Kimberlin, 2017; Razonable & Humar, 2013).

No que se refere ao estado imunitário da população residente em Portugal, o 2º Inquérito Serológico Nacional realizado em 2001-2002, veio apurar que neste país a seroprevalência do CMV é bastante elevada (77%) e que a primoinfeção ocorre maioritariamente nos primeiros anos de vida, entre o 2º e o 4º ano de idade (com 66,5% desta faixa etária a apresentar anticorpos IgG (imunoglobulina da classe G) anti-CMV positivos), período que coincide com a entrada da criança no jardim-de-infância. Este perfil serológico mantém-se até aos 15 anos, idade a partir da qual aumenta para os 71,3%, mantendo-se relativamente imutável até aos 29 anos. O valor da prevalência dos anticorpos contra o CMV vai de forma gradual aumentado nos grupos etários seguintes, até atingir um valor de 95,6 % nos indivíduos com mais de 65 anos. É de salientar que até ao escalão etário dos 5 aos 9 anos, inclusive, a proporção de anticorpos entre os dois géneros é semelhante, mas nos seguintes é observado uma proporção superior nos indivíduos do sexo feminino, quando em comparação com os indivíduos do sexo masculino. Destaca-se ainda, que 24,5% e 18,5% das mulheres em idade fértil (respetivamente, grupo etário dos 20 aos 29 anos e dos 30 aos 44 anos) estão predisponíveis à infeção por este vírus (Lopo, Vinagre & Palminha, 2004).

2.6 Vias de transmissão

O único reservatório conhecido do CMV é o Homem e por esta razão só as estirpes encontradas neste são infecciosas para o humano, não o sendo as restantes estirpes encontradas noutras espécies animais (D. S. Ross, Dollard, Victor, Sumartojo & Cannon, 2006).

A transmissão do CMV efetua-se por exposição, direta ou indireta, das superfícies mucosas do trato respiratório superior ou do trato genital, a praticamente qualquer fluído corporal, tal como, urina, sangue, fezes, saliva, lágrimas, colostro, leite materno, sémen,

secreções cervicais e outras secreções corporais de indivíduos infetados (Hayashi et al., 2011; Joseph et al., 2006; Ludwig & Hengel, 2009). Para além disto a transmissão também pode ocorrer por contacto com superfícies contaminadas com o partículas virais viáveis, por transfusões de sangue, por transplante de órgão sólido ou por transplante de células precursoras hematopoiéticas de doadores infetados (Gandhi & Khanna, 2004; Preiksaitis, Sandhu & Strautman, 2002; Stowell et al., 2012).

Assim, é possível agrupar as vias de transmissão do CMV de forma cronológica (Horta et al., 2007; Lopo, Vinagre, & Palminha, 2004; Pass & Anderson, 2014; Sia & Patel, 2000; Vamvakas, 2005):

1. Durante a gestação - origina a infeção congénita, transmitida de forma vertical, via transplacentária, que pode decorrer de uma infeção primária ou de uma infeção recorrente (reativação e reinfeção) materna;
2. Durante e após o parto - causa a infeção perinatal, que se refere a uma forma de transmissão vertical, que ocorre aquando da passagem do recém-nascido pelo canal de parto, por exposição a secreções cervicais contaminadas, ou durante a amamentação (mais frequente). Neste período neonatal a aquisição da infeção por transfusão sanguínea é irrelevante pois é consensual a utilização de sangue desleucocitado em todas as unidades neonatais portuguesas;
3. Durante a infância – período onde a taxa de infeção primária é superior. Ocorre por transmissão horizontal, e sucede, principalmente, do contacto com urina e saliva de crianças infetadas, sendo considerados como locais propícios a esta transmissão, os jardim-de-infância;
4. Após a infância – pode ocorrer por transmissão horizontal, habitualmente, adquirida por contacto com crianças infetadas, transmissão sexual ou contacto com saliva infetada. Pode ainda ocorrer por transmissão iatrogénica através de transfusão, transplante de órgãos sólidos ou transplante de células precursoras hematopoiéticas. A primeira tronou-se rara, desde que se recorre a estratégias de utilização de produtos sanguíneos seronegativos ou desleucocitados nos recetores seronegativos. Relativamente à transmissão via órgão transplantado, esta pode desencadear uma infeção primária (caso o recetor seja CMV seronegativo) ou uma reinfeção (quando o recetor CMV seropositivo recebe um órgão infetado que motiva a infeção com a estirpe recebida).

2.7 Patogénese e Resposta Imunitária

O CMV provoca uma infeção lítica e um efeito citopático característico nas células que infecta, daí a sua designação (Bruggeman, Debie, Grauls & Boven, 1986). Assim, a nível histológico, é possível observar alterações patológicas que consiste no aumento do volume da célula, podendo esta atingir 25 a 35µm, devido ao aumento do volume citoplasmático, e presença de corpos de inclusão intranucleares basófilos (que surgem por agregação de nucleoproteínas em replicação) rodeados por um halo. Estas mudanças conferem à célula infetada um aspeto, comumente denominado, de “olho de mocho” quando observada a microscópio ótico (Drew, 1992).

Em indivíduos imunocompetentes, a infeção primária tem, habitualmente, início com a ligação e entrada do vírus ao nível das células do epitélio da mucosa. Neste local o vírus começa a sua replicação lítica, após a qual, os viriões são libertados infetando as células (epiteliais e não epiteliais) adjacentes da submucosa. A esta fase de amplificação viral sucede uma primeira virémia com disseminação do vírus a determinados órgãos, como fígado, baço e nódulos linfáticos regionais. De seguida dá-se uma segunda virémia, que leva a uma infeção generalizada. O CMV infecta diversas células, tal como, células epiteliais (inclusive células da retina), células endoteliais, fibroblastos, leucócitos, células do músculo liso e células dendríticas. Quando a transmissão é feita através de órgão transplantado ou transfusão, não é necessária uma amplificação viral local, que preceda a disseminação para os órgãos viscerais ou tecido linfático regional, pois há acesso direto ao sistema circulatório (La Rosa & Diamond, 2012; Sacher et al., 2008).

Sendo um potente imunogénio, o CMV desencadeia uma resposta por parte de todo o sistema imunitário do hospedeiro. Assim, aquando da entrada do CMV na célula humana, o sistema imunitário inato é ativado, sendo desta forma a primeira linha de defesa do organismo. A deteção do CMVH é efetuada por uma classe de recetores celulares de superfície, da família dos recetores de reconhecimento de padrões (do inglês, *Pattern recognition receptors*, PRRs), denominada recetores *Toll-like* (do inglês, *Toll-like receptors*, TLR), nomeadamente o TLR2, que ativa desta forma o sistema imunitário inato. Estes recetores ao reconhecerem e interagirem com as glicoproteínas gB e gH do invólucro viral, iniciam uma cascata de sinalização, que resulta na ativação do NF-κB (fator de transcrição), na secreção de citocinas inflamatórias, como o interferão alfa/beta (em inglês, *interferon alpha/beta*, IFN-α/β), que recrutam células do sistema imunitário

inato - Células Apresentadoras de Antígenos (do inglês, *Antigen Presenting Cells*, APCs), macrófagos e células *Natural Killer* (NK) - e no aumento da expressão de moléculas coestimuladoras, como o CD80 e CD86, que são importantes na ativação do sistema imunitário adaptativo (Boehme, Guerrero & Compton, 2006; Boehme, Singh, Perry & Compton, 2004; Compton et al., 2003; Crough & Khanna, 2009; La Rosa & Diamond, 2012).

Após o CMV ter estabelecido infecção primária, as partículas virais completas ou incompletas (não possuem nucleocápside e ADN, em inglês, *dense bodies*) são processadas pelas APC e apresentadas às células T, através de proteínas de superfície do complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*, MHC) estimulando desta forma o sistema imune adaptativo (Ahlqvist & Mocarski, 2011; Khan, 2007).

A resposta do sistema imune adaptativo ao CMV está entre as mais fortes alguma vez documentadas no humano. A imunidade adaptativa tem um papel fundamental no controlo da infecção primária e, posteriormente, na manutenção da infecção latente, prevenindo a reativação do CMV (van de Berg, van Stijn, ten Berge & van Lier, 2008).

A resposta imune mediada por células-T tem um papel fundamental no controlo e restrição da replicação do CMV. Este grupo de células divide-se, maioritariamente, em linfócitos T citotóxicos (em inglês, *cytotoxic T-lymphocyte* ou *T cytotoxic cell*, Tc) e linfócitos T auxiliares (em inglês, *helper T-lymphocyte* ou *T helper cell*, Th), respetivamente, linfócitos T CD8⁺ (ativadas pelas MHC da classe I) e linfócitos T CD4⁺ (ativadas pelas MHC da classe II). Estas células desenvolvem resposta direcionadas a proteínas codificadas nas diferentes fases de replicação do CMV, isto é proteínas imediatamente precoces, proteínas precoces e proteínas tardias (Sylwester et al., 2005).

As células T CD4⁺ aparecem, em média, 10 dias após a deteção de DNA viral no sangue periférico e assumem um função preponderante na regulação da funcionalidade e diversidade das células T CD8⁺, assim como, estimulam a resposta imune humoral através da ligação a linfócitos B, o que conduz à sua ativação. As células T CD8⁺ surgem, em média, 14 dias após a primeira deteção das células T CD4⁺ e têm como função principal a lise de células infetadas. Em adição, ambas as células T, CD8⁺ e CD4⁺, sintetizam citocinas Th1, tais como, o interferão gama (em inglês, *interferon gamma*, IFN- γ) e o TNF- α , que têm efeito direto antiviral contra o CMV (Gamadia et al., 2003; Sester et al., 2002).

No decorrer da infeção primária, em consequência do reconhecimento dos epítomos virais, existe uma expansão da proliferação de células T específicas para o CMV. Após esta etapa, sucede uma fase de clearance viral, acompanhada por uma contração progressiva da população de células T, sendo preservada uma pequena população de células T de memória. No entanto, tal como acontece com os restantes herpesvírus, o CMV não é eliminado na sua totalidade, permanece latente nos monócitos e granulócitos do hospedeiro, podendo desta forma, dependendo do *status* imunitário do indivíduo, reativar (J. Kim, Kim, & Shin, 2015).

Como consequência das repetidas reativações do vírus ao longo da vida do hospedeiro, ocorrem sucessivas estimulações do sistema imunitário, o que leva a uma diferenciação das células do sistema imunitário e a um aumento progressivo do número de células T CD8⁺ e CD4⁺ específicas para o CMV. Assim as células T citotóxicas específicas para CMV poderão atingir 40% do *pool* total de células T CD8⁺ do indivíduo. O mesmo sucede com a população de células T CD4⁺, no entanto, de forma menos expressiva. Este fenómeno, denominado de *memory inflation*, é antagónico relativamente ao que se observa com outros agentes patogénicos, onde habitualmente a resposta imune diminui ao longo da vida do indivíduo. (Jackson et al., 2017; J. Kim, Kim, & Shin, 2015; Pourgheysari et al., 2007)

Para além da imunidade mediada por células T, é ainda desencadeada a resposta imune humoral, essencial no controlo da disseminação viral e consequente minimização das manifestações clínicas da doença (Jonjic et al., 1994). Os linfócitos B, são particularmente importantes neste ramo do sistema imunitário, pois são responsáveis pela produção de anticorpos neutralizantes contra diversas proteínas virais, entre as quais se destaca a glicoproteína gB do invólucro viral, responsável por aproximadamente 40 a 70% das imunoglobulinas anti-CMV secretadas (Britt, Vugler, Butfiloski & Stephens, 1990).

Assim, nos indivíduos imunocompetentes, é possível detetar, 2 a 6 semanas após a infeção, IgM (imunoglobulinas da classe M) anti-CMV. Estas podem persistir no soro do hospedeiro até 2 anos e podem ser detetadas através de métodos serológicos, indicando a presença de infeção ativa, aguda ou recente. Algumas semanas depois (6^a-8^a semana de infeção) começam a ser secretadas as IgG anti-CMV que persistem toda a vida e a sua deteção sugere uma infeção anterior ou passada por CMV (Gandhi & Khanna, 2004; Ross, Novak, Pati & Boppana, 2011; Zanghellini, Boppana, Emery, Griffiths & Pass,

1999).

Perante esta vigorosa resposta imunitária, o CMV tem a capacidade de acionar um conjunto de mecanismos de evasão imunitária, de forma a poder defender-se e subverter o sistema imunitário do hospedeiro. Neste sentido sintetiza inúmeras proteínas e microARNs (miARNs) de evasão imunitária que vão influenciar e modificar o ambiente no local da infeção de modo a limitar o reconhecimento do sistema imunitário. Estes mecanismos são maioritariamente expressos durante a infeção lítica, no entanto, são também importantes na infeção latente, dado que impedem a *clearance* viral por parte do sistema imunitário (Jackson et al., 2017; Tortorella, Gewurz, Furman, Schust & Ploegh, 2000).

2.8 Definições: Infeção vs. Doença Citomegálica

De forma a uniformizar e padronizar a definição de determinados conceitos chave utilizados no âmbito de investigações relacionadas com citomegalovírus humano são apresentados de seguida alguns termos.

Por “infeção citomegálica” compreende-se a presença de vírus, proteínas ou ácidos nucleicos virais em qualquer fluido ou tecido corporal (Ljungman, Griffiths & Paya, 2002). Distinguem-se 2 tipos de infeção por CMV (Azevedo et al., 2015; Sinclair & Sissons, 2006):

- Infeção ativa ou produtiva: caracteriza-se pela existência de replicação viral.
- Infeção latente: após a resposta imune inicial, o vírus persiste em determinadas células do hospedeiro, utilizando determinados mecanismos para evasão do sistema imune e sobrevivência, não havendo, no entanto, produção de novas partículas virais.

Entende-se por “doença citomegálica” a infeção por CMV, à qual está associado um conjunto de sinais e sintomas específicos inerentes a este vírus (Ljungman, Griffiths & Paya, 2002). Esta pode ser categorizada em (Razonable & Humar, 2013):

- Síndrome citomegálica: caracteriza-se pela presença de sinais e sintomas de doença citomegálica associada a uma replicação viral no sangue periférico.
- Doença citomegálica tecido-invasiva: define-se pela presença de sinais e sintomas específicos em órgãos alvo e pela evidência histológica do efeito

citopático causado pelo CMV. Podendo estar ou não associada uma replicação viral no sangue periférico.

2.9 Infecção primária, Infecção latente e Infecções recorrentes

Aquando do primeiro contacto do indivíduo imunocompetente com o vírus surge a infecção primária, que é frequente assintomática, podendo em raros casos conduzir a uma complicação benigna e autolimitada designada de síndrome mononucleósica. No entanto, em doentes imunocomprometidos ou subdesenvolvidos (fetos e recém-nascidos), o CMV é considerado uma importante causa de morbilidade e mortalidade (Crough & Khanna, 2009; Ramanan & Razonable, 2013).

Após a infecção primária, e apesar da robusta resposta imunitária do hospedeiro, há uma adaptação viral ao sistema imune, alcançando-se assim um equilíbrio homeostático entre ambos, e, por consequência, a eliminação do vírus nunca é conseguida (La Rosa & Diamond, 2012). Deste modo o CMV estabelece e mantém latência em determinadas células do hospedeiro, nomeadamente, nas células da linhagem mieloide. Assim é possível, nesta fase, detetar o genoma viral em monócitos do sangue periférico, sendo este o local major de persistência do CMV, e em células progenitoras hematopoiéticas CD34⁺ (Lau et al., 2016; Taylor-Wiedeman, Sissons, Borysiewicz & Sinclair, 1991).

Uma característica importante da infecção latente é o facto de não se observar produção de viriões infecciosos, isto porque um complexo promotor viral (em inglês, *major immediate early promote* – MIEP), responsável pelo controlo da expressão de genes imediatamente precoces, se encontra reprimido e consequentemente a expressão de genes virais líticos e a replicação viral encontram-se suprimidas (Wills, Poole, Lau, Krishna & Sinclair, 2015).

O CMV permanece no organismo infetado, sobre a forma de infecção latente, podendo esporadicamente, devido a episódios de imunossupressão, inflamação, infecção ou stress, ocorrer reativação com produção de novas partículas virais (Kutza, Muhl, Hackstein, Kirchner & Bein, 1998; Prösch et al., 2000). Estes eventos de reativação ou infecção de novo por CMV não são habitualmente detetados em indivíduos imunocompetentes (La Rosa & Diamond, 2012).

São diversos os mecanismos que levam à reativação do CMV, nomeadamente, através do fator de necrose tumoral alfa (em inglês, *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α) que

leva à ativação da proteína cinase C e do factor nuclear kappa B (em inglês, *nuclear factor kappa B*, NF- κ B) e consequente expressão dos genes imediatamente precoces, necessária para uma replicação viral completa. A ativação destes genes, pode ser igualmente conseguida através de um mecanismo dependente de catecolaminas, epinefrina e norepinefrina, que aumentam a concentração de adenosina monofosfato cíclico (em inglês, *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) na célula, levando desta forma à ativação do MIEP. Este último mecanismo pode ser igualmente estimulado via prostaglandinas inflamatórias produzidas durante um processo inflamatório (Crough & Khanna, 2009).

Outro processo que leva a infeções recorrentes é a reinfeção, que se caracteriza pela presença de uma infeção provocada por uma estirpe diferente das anteriores (Ljungman et al., 2002). Isto só é possível graças à grande variabilidade genética que este vírus apresenta, que pode ser comparável com aquela observada nos vírus ARN, considerados como ponto de referência entre a população viral, no que diz respeito à grande diversidade. O CMV possui um considerável conjunto de genes, que abrange a grande maioria dos ORFs do seu genoma, que apresentam uma enorme variação entre as diferentes estirpes do vírus (Dolan et al., 2004; Renzette, Gibson, Jensen & Kowalik, 2014). Assim é possível afirmar que, o CMV não se apresenta como um genótipo definido, mas sim como uma diversidade de estirpes diferentes, com uma grande variedade de possíveis combinações genóticas (Puchhammer-Stockl & Gorzer, 2011). Esta variabilidade genética é exibida entre indivíduos (em inglês, *interhost variability*) e dentro do mesmo indivíduo (em inglês, *intrahost diversity*), podendo apresentar diversidade inter-órgão, sendo denominado, este último fenómeno, de compartimentalização e é visualizado em diversos hospedeiros, nomeadamente, adultos e crianças saudáveis, crianças com infeção congénita, doentes submetidos a transplantação e doentes infetados com o VIH (Renzette et al., 2015). A diversidade de estirpes de CMV intra-indivíduo é, provavelmente, o resultado de sucessivas reinfeções, que são relativamente comuns (podendo ocorrer, em algumas populações, a uma taxa anualizada, de 10%) entre indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos, e não da transmissão de um conjunto de diversas estirpes de CMV no momento da infeção primária. Há evidências que correlacionam as infeções por estirpes mistas com a progressão da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) em doentes infetados pelo

VIH, o aumento da carga viral do CMV e gravidade da doença citomegálica (Renzette et al., 2014).

2.10 Infeção citomegálica nos diversos hospedeiros

Para a maioria das pessoas, a infeção por CMV é assintomática, no entanto, pode levar a graves consequências em indivíduos de grupos específicos, nomeadamente, feto, recém-nascido e indivíduos imunodeprimidos, incluindo, doentes infetados pelo VIH e transplantados (Gandhi & Khanna, 2004).

2.10.1 Indivíduo imunocompetente

A infeção citomegálica, adquirida após o nascimento por indivíduos imunocompetentes, é habitualmente assintomática, conduzindo raramente a doença citomegálica. Somente 10 % dos casos de infeção primária originam doença, que se caracteriza, mais frequentemente, por um conjunto de manifestações denominada de “síndrome mononucleósica” (Eddleston, Peacock, Juniper, & Warrell, 1997). Como o nome sugere, esta apresenta uma sintomatologia muito semelhante à mononucleose infecciosa, provocada pelo vírus Epstein-Barr (do inglês, *Epstein-Barr virus*, EBV), caracterizando-se pela presença de febre, astenia, mialgia, cefaleias e hepatomegalia, podendo estes sintomas persistir durante semanas. Podem ainda surgir esplenomegalia, linfadenopatia e faringite, apesar de menos frequentes, ao contrário do que se verifica com a infeção por EBV. Outras complicações raras, mas graves, da infeção primária citomegálica, são síndrome de Guillain-Barré, meningoencefalites, artralgia, artrite, colite ulcerativa, pneumonia, hepatite, miocardite, anemia hemolítica e trombocitopenia (Gandhi & Khanna, 2004; Varani & Landini, 2011; Wreghitt, Teare, Sule, Devi & Rice, 2003).

Nos episódios de reativação da infeção latente, que ocorrem periodicamente, há a produção de partículas virais que são eliminadas através da urina, saliva e outras secreções corporais do hospedeiro. Esta eliminação, em indivíduos imunocompetentes, ocorre de forma assintomática e durante curtos período (Cannon, Hyde & Schmid, 2011).

Nestes indivíduos o diagnóstico da infeção primária é efetuado através da história clínica e de estudos serológicos, através da pesquisa de IgM e IgG específicas para o CMV, podendo ser adicionalmente acrescentada a determinação da avidéz das IgG (Revello et al., 1998).

2.10.2 Grupos de risco na infecção por citomegalovírus

2.10.2.1 Infecção congénita e perinatal

O CMV é o agente mais comum a causar infecção congénita, atingindo entre 0,2 a 2,0 % de todos os recém-nascidos (Michael Boeckh & Geballe, 2011). A transmissão materno-infantil intrauterina do CMV, ocorre como resultado da infecção na grávida, que durante este período gestacional apresenta um sistema imunitário não suprimido, mas sim ajustado à sua condição única, o que modifica a resposta imunitária materna a estímulos externos, como o são os microrganismos (Mor & Cardenas, 2010; Revello & Gerna, 2004). Por esta razão, a incidência da infecção citomegálica encontra-se aumentada nas grávidas, o que, por consequência, aumenta o risco de transmissão materno-fetal. Assim, em grávidas seronegativas a probabilidade de infecção primária é de 1 a 4%, o que se traduz num risco de transmissão ao feto de 30-40%, sendo este superior no terceiro trimestre da gravidez. Em grávidas com imunidade prévia em que ocorre infecção recorrente, quer seja por reativação ou por reinfeção, o risco de transmissão ao feto decresce para cerca de 1,4% (Kenneson & Cannon, 2007; Revello & Gerna, 2004; Swanson & Schleiss, 2013). Aproximadamente 10-15% dos recém-nascidos que nascem infetados pelo CMV apresentam sinais e sintomas de doença citomegálica ao nascimento, tais como, baixo peso, trombocitopenia com petéquias, púrpura, hepatite com hepatoesplenomegalia e icterícia, pneumonia, coreorretinite, alterações neurológicas, calcificações intracranianas, surdez sensorineural ou aumento da alanina aminotransferase. Entre as crianças com infecção sintomática, cerca de 40-58% apresentam sequelas permanentes, a nível neurológico, auditivo e visual, e aproximadamente, 30% não sobrevive. Das crianças que nascem infetadas, mas que se apresentam assintomáticas no período neonal, cerca de 7-15% sofrem sequelas tardias, nomeadamente, surdez sensorineural ou atraso mental (Dollard, Grosse & Ross, 2007; Goderis et al., 2014; Malm & Engman, 2007).

As infeções perinatais são mais prevalentes que as infeções congénitas e geralmente assintomáticas. No entanto, em recém nascidos prematuros não se mantém este padrão, aumentado a probabilidade de surgirem determinadas patologias, tais como, pneumonia, hepatite e septicémia (Kim, 2010).

O diagnóstico da infeção congénita é dividido em pré-natal e pós-natal, e é feito com base na história clínica e resultados de diagnóstico laboratorial. No período pré-natal não há consenso sobre se se deve ou não fazer este rastreio, havendo opiniões divergentes, isto devido à ausência de terapêutica eficaz que possa ser utilizada nesta fase. A ser feito, o diagnóstico tem como objetivo único a deteção da infeção primária na grávida, visto ser mais provável a transmissão e lesão fetal, ao que acrescem, as dificuldades técnicas de deteção das infeções recorrentes (Lazzarotto, Guerra, Gabrielli, Lanari, & Landini, 2011). Assim, inicialmente são efetuados estudos serológicos, seguidos de técnica confirmatória de determinação da avidez das IgG, após os quais, em caso de confirmação do diagnóstico de infeção primária, são realizadas pesquisas do vírus ou de antígenos virais, no líquido amniótico, com o objetivo de se verificar a transmissão vertical ao feto. Esta última pode ser realizada a partir da 21^a semana de gestação e utiliza como métodos laboratoriais de diagnóstico, técnicas de biologia molecular e cultura celular. Caso sejam detetadas alterações não esclarecidas nas ecografias é igualmente efetuada amniocentese para pesquisa de CMV (Hughes & Gyamfi-Bannerman, 2016; Ross, Novak, Pati & Boppana, 2011).

No período pós-natal, o diagnóstico da infeção congénita é efetuado através da deteção do vírus ou de antígenos virais em amostras de urina ou saliva das primeiras 2 semanas de vida do recém-nascido, de forma a garantir que a transmissão do vírus foi efetuada antes do nascimento. Nesta fase o método de diagnóstico de referência é o da cultura celular, apesar de também ser utilizado o da Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*, PCR). Após as 2 semanas de idade a deteção do vírus pode significar uma infeção congénita ou uma infeção perinatal. Assim, o diagnóstico tardio da infeção congénita só é possível recorrendo aos cartões do diagnóstico precoce (*Guthrie Cards* ou “teste do pézinho”) que contêm uma amostra de sangue da primeira semana de idade, e procedendo à técnica de PCR (Ross et al., 2014; Soetens et al., 2008).

Relativamente ao diagnóstico da infeção perinatal, este é feito com base na história clínica e é confirmado quando se verificam em simultâneo, resultados negativos na pesquisa de CMV ou de antígenos virais, por cultura celular ou PCR, em amostra de urina, nos primeiros 21 dias de vida e resultados positivos na pesquisa deste vírus ou de antígenos virais, utilizando os mesmos métodos de diagnóstico, em amostra de urina ou

saliva após os primeiros 21 dias ($\geq 22^\circ$ dia). Isto porque, o CMV só começa a ser excretados a partir da 3-12ª semana após exposição ao vírus (Ross et al., 2011).

2.10.2.2 Indivíduo imunocomprometido

I Hospedeiro VIH-positivo

O CMV é considerado um importante agente oportunista, nos indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (Sepkowitz, 2002).

É possível distinguir, essencialmente, 2 períodos temporais no que diz respeito à coinfeção CMV/VIH, um período que precede e outro que sucede a introdução da Terapêutica Antirretroviral de Elevada Eficácia (do inglês, *Highly Active Antiretroviral Therapy*, HAART), que é um regime terapêutico que combina três ou mais fármacos antirretrovirais de pelo menos duas classes diferentes, atualmente designada terapêutica antirretroviral combinada (TARc). Antes da HAART ter surgido, a infeção por CMV era uma das infeções oportunistas mais frequente nos indivíduos infetados pelo VIH, afetando aproximadamente 40% destes doentes (Steininger, Puchhammer-Stöckl & Popow-Kraupp, 2006). Com o desenvolvimento deste tipo de terapêutica, em 1995-1996, assistiu-se a uma redução, bastante significativa, na incidência da infeção e, consequentemente, na doença citomegálica em doentes VIH-positivo, o que culminou na diminuição da morbilidade e mortalidade em doente coinfetados CMV/VIH (Gómez-Mora et al., 2017; Palella et al., 1998). Isto acontece, devido à reposição do sistema imunitário, nomeadamente das células T $CD4^+$, o que impede a replicação do CMV (Verbraak et al., 1999).

Apesar da evolução da terapêutica antirretroviral a infeção por CMV continua a ser bastante problemática para estes doentes, existindo evidência que sugere que, de forma direta e/ou indireta, não só acelera a progressão para SIDA, como é um factor de risco independente de mortalidade (Griffiths, 2006; Spector et al., 1999).

São diversos os fatores que contribuem para a aparecimento de doença por CMV em doente infetados por HIV, tais como, contagem de células $CD4^+$ inferiores a 50 células/mm³, doentes que não estejam a receber a TARc ou que o esquema terapêutico não esteja a ser eficaz, historial clínico de infeções oportunistas prévias, virémia por CMV elevada e níveis elevados de ARN VIH superiores a 100 000 cópias/mL. Nestes

indivíduos, o CMV pode causar doença disseminada ou localizada em órgãos-alvo, maioritariamente em indivíduos previamente infetados por este herpesvírus, onde, após a reativação da infeção latente ou reinfeção por uma nova estirpe, se observa a replicação viral descontrolada devido à deficiente função das células T (*Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents*, 2017).

A manifestação clínica mais prevalente de doença por CMV em indivíduos portadores do VIH é a retinite, sendo uma importante causa de cegueira nestes indivíduos (Karavellas et al., 1999). Podem surgir ainda outras manifestações clínicas, tais como, doença gastrointestinal (como por exemplo, colite, esofagite e gastrite), encefalite e pneumonia (Steininger et al., 2006).

Nestes doentes a serologia é utilizada com o objetivo de revelar os indivíduos em risco de reativação e não como meio de diagnóstico. Neste contexto, o diagnóstico é baseado essencialmente na história clínica e na resposta à terapêutica, isto porque nestes doentes a deteção do CMV tem um valor preditivo positivo e negativo baixos. Assim recorre-se a métodos laboratoriais de diagnóstico, em casos de suspeita de pneumonite (pesquisa por PCR e antigenémia no sangue periférico, cultura celular e estudos histológicos nos lavados bronco-alveolares), de infeção do sistema nervoso central (pesquisa por PCR no líquido cefalorraquidiano), de doença gastrointestinal (pesquisa por PCR e antigenémia no sangue periférico, cultura celular e estudos histológicos a partir de uma biópsia dos tecidos) e de retinite (pesquisa por PCR no humor aquoso ou vítreo) (*Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents*, 2017).

Nestes indivíduos a deteção do CMV é também importante na monitorização e otimização da terapêutica antirretroviral e anti-CMV (Ross et al., 2011).

II Hospedeiro submetido a transplante

O Citomegalovírus, apelidado por Henry H. Balfour de “o *troll* da transplantação”, é o principal agente infeccioso oportunista em doentes submetidos a transplante, refletindo assim a incapacidade do sistema imune deprimido do hospedeiro em restringir a replicação viral (Balfour, 1979; Carbone, 2016; de la Cámara, 2016). Apesar da evolução neste âmbito, decorrente da utilização de terapias preventivas e de diagnósticos mais precoces, a infeção por CMV continua a ser uma das principais causas de morbilidade e mortalidade, no período pós-transplante, em recetores de transplante de órgão sólido (em

inglês, *Solid Organ Transplant*, SOT) e transplante de células precursoras hematopoiéticas (em inglês, *Hematopoietic Stem Cell Transplant*, HSCT) (Hirsch et al., 2013; Kwon, Jung, Ko, Lee & Cho, 2015).

A imunodepressão nestes indivíduos está associada essencialmente a 2 fatores. O primeiro é a patologia de base que suscita o transplante e que, salvo raras exceções, como hepatites fulminantes, requer ou produz imunossupressão antes do transplante. O segundo e principal fator causador de imunodepressão é a imunossupressão iatrogénica que estes doentes recebem após o transplante (e até antes deste) e que pode ser aumentada da sua dose habitual em casos especiais, como o são a rejeição de órgão ou a doença do enxerto-versus-hospedeiro (L'Huillier & Kumar, 2015). Estes regimes terapêuticos de imunossupressão são essenciais no indivíduo transplantado, uma vez que previnem e limitam a possibilidade de rejeição do transplante mediada pelas células T. Em contrapartida, ao suprimirem a imunidade mediada por células CD4⁺ e CD8⁺, fundamentais no controlo e manutenção da infeção latente do CMV, estão a contribuir para a replicação descontrolada deste vírus e elevados níveis de virémia, podendo levar a graves consequências para o hospedeiro, tais como, disseminação viral e doença citomegálica potencialmente fatal (Rosa & Diamond, 2012).

As células que contêm o CMV latente servem como vetor primário da transmissão do vírus a estes indivíduos suscetíveis. Visto o CMV latente ter uma ampla distribuição no organismo humano, a sua transmissão a estes indivíduos é feita através do órgão transplantado ou através de produtos sanguíneos, no entanto, a primeira é considerada a causa principal, sobretudo devido à utilização de estratégias preventivas de transfusão de produtos sanguíneos seronegativos ou desleucocitados em recetores seronegativos (Razonable & Hayden, 2013; Vamvakas, 2005).

No recetor de transplante podem verificar-se 2 padrões de infeção por CMV: uma infeção primária, caso o recetor não tenha imunidade prévia (seronegativo) (R-) e o seu dador seropositivo (D+) para este vírus; ou de uma infeção recorrente, quando o recetor é seropositivo (R+). Esta última pode ser consequência de uma reativação, quando o vírus latente é reativado como resultado da imunossupressão, ou por reinfeção, quando o recetor recebe um órgão infetado com uma nova estirpe desencadeando, desta forma, infeção (Eid & Razonable, 2010).

II.a HSCT

O transplante de células precursoras hematopoiéticas tem como objetivo primordial, o restabelecimento da função linfohematopoiética em doentes cujo sistema imunitário ou a medula óssea se encontra defetivo ou danificado. Este procedimento envolve a infusão intravenosa de células estaminais provenientes da medula óssea, sangue periférico ou sangue do cordão umbilical, de um dador (transplante alogénico, na sua grande maioria, realizados em doente com linfomas ou tumores hematológicos) ou do próprio recetor (transplante autólogo, muito realizados em doentes com mielomas múltiplos e linfomas não-Hodgkin). Previsivelmente, o risco de infeção está consideravelmente aumentado nos indivíduos sujeitos a HSCT alogénico, em comparação com o HSCT autólogo, uma vez que estes têm um maior risco de rejeição de transplante e de doença do enxerto-versus-hospedeiro (DEVH; em inglês, *graft-versus-host disease*, GVHD; doença mediada pelo sistema imunitário, sendo considerada a maior causa de morbilidade e mortalidade em doentes submetidos a HSCT, e resulta do reconhecimento e ataque, por parte das células T do enxerto do dador, sobre as células do recetor)(Jacobsohn & Vogelsang, 2007; L'Huillier & Kumar, 2015; Perumbeti, 2016).

Mundialmente, mais de 60 000 doentes por ano recebem transplantes de células precursoras hematopoiéticas, dos quais 53% são transplantes autólogos e 47% são transplantes alogénicos (Niederwieser et al., 2016).

Nestes indivíduos, o CMV é um dos principais agentes oportunistas após o transplante. São diversos os fatores de risco que potenciam a infeção por CMV em doentes sujeitos a HSCT. O *status* serológico do recetor e dador é considerado o principal fator de risco de doença citomegálica nestes indivíduos, sendo a seropositividade nos recetores o risco mais elevado. Nestes, o transplante procedente de um dador não idêntico seropositivo (D+/R+) conduz a um aumento da sobrevivência aos 5 anos e da sobrevivência sem eventos e a uma diminuição da mortalidade relacionada com o transplante, em comparação com um dador não idêntico seronegativo (D-/R+), potencialmente devido ao efeito protetor da imunidade que é transferida do dador. O mesmo não acontece com o HSCT entre indivíduos idênticos, onde se observa uma sobrevivência global e mortalidade relacionada com o transplante semelhantes no recetor seropositivo (R+), quer se trate de um dador seropositivo (D+) ou seronegativo (D-) (Ljungman et al., 2003). Por outro lado, o risco de infeção e doença nos recetores

seronegativos que recebem o HSCT de um dador seropositivo (D+/R-) é baixo (Ariza-Heredia, Nesher & Chemaly, 2014). Evidentemente, o risco de infeção primária no recetor seronegativo, cujo dador é igualmente seronegativo (D-/R-), é muito baixa, desde que se utilizem estratégias preventivas de transfusão de produtos sanguíneos seronegativos ou desleucocitados nos recetores seronegativos (Boeckh & Geballe, 2011). Desta forma, no pós-transplante de células precursoras hematopoiéticas, observa-se que a reativação da infeção latente (recetores seropositivos) tem maior incidência do que a infeção primária (recetores seronegativos), aproximadamente, 80% e 30%, respetivamente, contrastando com o que acontece com o transplante de órgão sólido (Ljungman, 2007).

Outros fatores de risco associados à infeção por CMV após HSCT são a idade avançada do recetor, o transplante de células estaminais do sangue do cordão umbilical, a irradiação corporal total, a quimioterapia com regimes contendo fludarabina ou globulina antitimocítica, a transplantação de células estaminais com depleção das células T, a doença do enxerto-versus-hospedeiro aguda ou crónica, a baixa contagem de células CD4⁺ no recetor, a não deteção de células T específica para CMV no recetor seropositivo, a utilização de altas doses de corticoides e o grau de compatibilidade HLA (do inglês, *Human Leukocyte Antigen* – Antígenos leucocitários humanos) entre o dador e o recetor (Ariza-Heredia et al., 2014; Boeckh & Geballe, 2011).

De entre os indivíduos submetidos a transplante de células precursoras hematopoiéticas alogénico e autólogo, aproximadamente 30 % e 5%, respetivamente, acabam por desenvolver doença citomegálica, sendo que, com a utilização de terapias antivirais preventivas, a prevalência de doença por CMV, nos primeiros 100 dias após o transplante HSCT, diminuiu para 3-6%. Em contrapartida, a prevalência da doença tardia por CMV nestes indivíduos (que surge após os primeiros 100 dias) é de 18% (Chaer et al., 2016; Fraser, Walker & Canadian Blood and Marrow Transplant Group, 2004).

Nestes doentes as manifestações clínicas mais comuns, nos primeiros 100 dias que sucedem o transplante, são a pneumonia e o envolvimento gastrointestinal, que pode afetar a totalidade do trato, sendo a primeira a manifestação mais grave nestes doentes, apresentado uma mortalidade superior a 50%. Por outro lado, as manifestações clínicas tardias do CMV incluem, mais uma vez, o envolvimento pulmonar e gastrointestinal, e adicionalmente, apesar de raramente, retinite e doença do sistema nervoso central,

habitualmente, encefalite. Em adição a estes efeitos diretos, o CMV pode igualmente causar efeitos indiretos, nomeadamente infeções bacterianas e fúngicas secundárias e GVHD (Boeckh et al., 2003; Ljungman, Hakki & Boeckh, 2011).

II.b SOT

O transplante de órgão sólido tem como finalidade a reposição da função biológica de determinado órgão que se encontra em falência orgânica irreversível ou terminal, sendo considerado frequentemente, neste contexto, como a melhor alternativa terapêutica em órgãos vitais, tais como, rim, fígado, pulmão, pâncreas e coração (Committee for medicinal products for human use, 2008; Keskin, Cakmak & Tamam, 2017). Para tal, é transferido, para o doente, um enxerto de um órgão, tecido ou células proveniente de um dador (transplante alogénico, se os indivíduos implicados forem da mesma espécie, mas geneticamente diferentes; ou transplante isogénico, caso estes sejam geneticamente idênticos; ou transplante xenogénico, se estes indivíduos forem de espécies diferentes) ou do próprio recetor (transplante autólogo) (Edinur, Manaf & Che Mat, 2016).

Em 2015, foram realizados mundialmente, cerca de 126 670 SOT, dos quais, aproximadamente, 67% foram transplantes de rim, 6% de fígado, 6% de coração, 4% de pulmão, 2% de pâncreas e 0,2% de intestino delgado (Carmona et al., 2017).

Nestes indivíduos, a infeção por CMV é a principal complicação viral após o transplante (Razonable, 2013). Existem vários fatores de risco que predis põem o indivíduo sujeito a SOT a infeção por citomegalovírus, sendo considerado como principal fator de risco o *status* serológico do recetor e do dador. Assim, os doentes seronegativos que recebem um transplante de órgão de um dador seropositivo (D+/R-) têm o risco mais elevado de infeção por CMV, isto porque a imunossupressão iatrogénica a que estão sujeitos impede a constituição de uma resposta imunitária efetiva contra o vírus. Em contrapartida, os recetores seropositivos que recebem um transplante de órgão de um dador seropositivo ou seronegativo (D-/R+ ou D+/R+) têm um risco intermédio, e os recetores seronegativos cujo dador é seronegativo (D-/R-) têm um risco baixo (inferior a 5%) de infeção por este vírus. Estes últimos (D-/R-), adquirem a infeção por meio de transmissão natural na comunidade, desde que se recorram a estratégias preventivas de transfusão de produtos sanguíneos seronegativos ou desleucocitados nos recetores seronegativos (Fishman et al., 2007; Razonable et al., 2013).

Outro fator de risco para doença por CMV é o tipo de órgão transplantado, essencialmente devido à quantidade de tecido linfóide e intensidade da imunossupressão que varia com o tipo de órgão em causa. Assim a maior incidência encontra-se no transplante de intestino delgado, seguido pelo transplante de pulmão, pâncreas, coração e por último, o transplante de fígado ou rim (Lumbreras et al., 2014; Razonable & Humar, 2013).

Em adição, são ainda considerados como fatores de risco, a imunossupressão intensa, a utilização de determinadas terapias imunossupressoras (tais como, globulina antitímócito e muromonab-CD3), fatores relacionados com o recetor de transplante, onde se incluem, a idade avançada, comorbilidades, fatores genéticos (polimorfismos em determinados genes, tal como, no gene do recetor Toll-like) leucopénia e linfopénia, rejeição do enxerto, idade avançada do dador, incompatibilidade HLA, infeções concomitantes, tais como, com outros vírus herpes (Herpesvírus humano 6 [HVH-6] e Herpesvírus humano 7 [HVH-7]) e carga viral elevada (Eid & Razonable, 2010; Futuhi, Saber, Nemati, Einollahi & Rostami, 2015; Razonable et al., 2013).

A infeção por CMV em recetores de transplante de órgão sólido apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, desde uma simples infeção assintomática, habitualmente associada a uma carga viral baixa, até uma severa doença citomegálica, amplamente disseminada e potencialmente fatal, caracterizada pela carga viral elevada (Razonable & Hayden, 2013). Neste contexto a infeção por CMV pode causar efeitos diretos e indiretos. Os efeitos diretos incluem: o síndrome citomegálico, considerada como a manifestação clínica mais comum de doença por CMV no pós-transplante de órgão sólido, é caracterizado por um quadro clínico semelhante a um síndrome gripal, com hipertermia, anorexia, mialgias e artralgias, frequentemente acompanhado de leucopenia e trombocitopenia; a doença citomegálica tecido-invasiva, ocorre num pequeno número de casos de doença citomegálica, envolve mais comumente o trato gastrointestinal, apesar de poder afetar qualquer órgão e está associado a patologias, tais como, gastrites, enterites, colites, pneumonites, encefalites, hepatites, nefrites, miocardites, pancreatites, doenças do sistema nervoso central e raramente, retinites. Esta invasão citomegálica pode também envolver o enxerto transplantado, causando hepatites, nefrites, pneumonites, miocardites e pancreatites nos recetores de transplantes de fígado, rim, pulmão, coração e pâncreas, respetivamente (Humar & Michaels, 2006; Ramanan & Razonable, 2013). No que diz respeito aos efeitos indiretos, estes surgem como consequência das propriedades

imunomodeladoras deste vírus, e são exemplo destes, o aumento da predisposição para outras infeções oportunistas, como sejam, infeções fúngicas (tal como as causadas por *Pneumocystis carinii*), bacterianas (tal como as causadas por *Listeria monocytogenes*) e outras infeções virais, o aumento do risco e severidade da recorrência do vírus da hepatite C em recetores de transplante de fígado com hepatite C crónica e a maior propensão para desenvolvimento de infeção pelo vírus Epstein-Barr que está associado à doenças linfoproliferativas pós-transplante. São ainda considerados efeitos indiretos deste vírus, a rejeição aguda e crónica do enxerto, a falência do enxerto, o aumento da trombose vascular, a vasculopatia coronária após transplante cardíaco, a fibrose intersticial e a nefropatia crónica do enxerto após transplante renal, o síndrome do desaparecimento do ducto biliar e a trombose arterial hepática após transplante hepático, o síndrome de bronquiolite obliterante após transplante pulmonar, ocorrência de diabetes mellitus no pós transplante e o aumento do risco de morte (Crough & Khanna, 2009; Luscalov, Loga, Dican & Junie, 2016; Roman et al., 2014).

II.c Diagnóstico nos doentes transplantados

O diagnóstico do CMV nos indivíduos sujeitos a transplante é feito com base no historial clínico e confirmado pelos resultados laboratoriais. Isto porque as manifestações clínicas da doença por CMV nestes indivíduos não são patognomónicas deste vírus. Neste contexto, são utilizados vários métodos de diagnóstico laboratorial, os quais são adaptados dependendo da situação clínica em questão (Razonable & Hayden, 2013):

- Estudos Serológicos

A serologia, nestes indivíduos, só é utilizada no período pré-transplante, com o objetivo de determinar o *status* serológico do dador e do recetor do transplante, de forma a poder acautelar e definir o risco de infeção e de doença citomegálica no período pós-transplante (Ross, Novak, Pati & Boppana, 2011).

Após o transplante, o papel da serologia ao nível do diagnóstico de infeção e doença ativa por CMV é bastante limitado, sendo inclusive não recomendada a sua utilização. Da mesma forma, neste período, este método de diagnóstico laboratorial não é utilizado na monitorização da evolução clínica da infeção e da resposta à terapêutica. As limitações desta técnica no período pós-transplante devem-se à imunossupressão e

consequente incapacidade de desenvolver uma resposta humoral adequada por parte destes indivíduos (Razonable, Paya & Smith, 2002).

- Método de deteção de ácidos Nucleicos

Atualmente, os métodos de deteção de ácidos nucleicos, em particular os métodos de quantificação de carga viral que recorrem à tecnologia PCR em tempo real (em inglês, *real time*-PCR, RT-PCR), são os mais utilizados para monitorizar doentes em risco de doença citomegálica, orientar o início da terapêutica *preemptiva*, diagnosticar infeção e doença citomegálica ativa e monitorizar a resposta à terapêutica antiviral em doentes submetidos a transplante (Dioverti & Razonable, 2015).

- Antigenémia

A antigenémia é o método não molecular mais utilizado para um rápido e sensível diagnóstico da infeção citomegálica em doentes transplantados. Adicionalmente, nestes doentes, permite a monitorização do risco de doença citomegálica, a orientação do início da terapêutica *preemptiva* e a monitorização da resposta à terapêutica (Razonable & Humar, 2013).

- Cultura de células

O método de cultura de células é altamente específico na deteção do CMV, no entanto tem como principais desvantagens, a baixa sensibilidade e o facto de ser um método muito lento. Por estes motivos, tem vindo a ser substituído pelos métodos de biologia molecular e antigenémia, no diagnóstico de infeção e doença citomegálica em doentes transplantados. No entanto continua a ter um papel importante na deteção do CMV em amostras de tecido, dada a limitação dos métodos anteriores neste tipo de amostra (Beam & Razonable, 2012; Ramanan & Razonable, 2013).

- Histopatologia

Este método é utilizado para confirmação de doença tecido-invasiva por CMV em doentes transplantados, quando há suspeita de rejeição de órgão, de coinfeção por outro patógeno ou de doença “compartimentalizada” (Coffin, Burak, Hart & Gao, 2006; Navaneethan, Venkatesh & Wang, 2011; Preiksaitis, Brennan, Fishman & Allen, 2005).

2.11 Métodos de diagnóstico e monitorização laboratorial

Nas últimas décadas, o reconhecimento da importância clínica do CMV nos indivíduos imunocomprometidos e subdesenvolvidos, levou a um grande desenvolvimento nos métodos de diagnóstico e monitorização da infeção por CMV (Ross, Novak, Pati & Boppana, 2011). Destacando-se a alteração do tipo de técnica utilizada, primeiramente, com a passagem de métodos de diagnóstico de cultura de células para métodos de deteção de antígenos (antigenémia) e posteriormente, a passagem desde para métodos de deteção de carga viral por métodos moleculares (Boeckh & Boivin, 1998; Cariani et al., 2007).

São diversos os métodos disponíveis atualmente para a deteção do CMV, os quais são utilizados e adaptados segundo a situação clínica em causa, e que serão em seguida discriminados.

2.11.1 Serologia

A serologia tem como objetivo a pesquisa no sangue periférico de anticorpos específicos contra o Citomegalovírus, nomeadamente as IgM e as IgG. São diversas as metodologias utilizadas para deteção de anticorpos, destacando-se a ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, Ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática) (El Sanousi et al., 2016).

A serologia permite definir o *status* serológico de um indivíduo e distinguir uma infeção recente/aguda de uma infeção antiga e uma infeção primária de uma infeção recorrente (Ross et al., 2011).

Nos indivíduos seronegativos não é possível detetar IgG, ao passo que nos indivíduos seropositivos há deteção desta imunoglobulina (Jaskula, Bochenska, Kocwin, Tarnowska & Lange, 2012).

A deteção isolada de IgM (primeiro anticorpo a ser produzido após a infeção) sugere uma infeção primária ou recente. Em contrapartida, a deteção em simultâneo de IgM e IgG (segunda imunoglobulina a ser produzida) não é por si só sinónimo de infeção primária, isto porque as IgM surgem não só como consequência de uma infeção primária, mas também, durante a reinfeção e reativação. Assim, neste contexto, é necessário recorrer à determinação da avididade das IgG, de forma a distinguir a infeção primária da infeção recorrente. Anticorpos com baixo índice de avididade ou afinidade são sinónimos de

infecção primária, ao passo que, anticorpos com índice de avidéz elevado são sinónimos de infecção recorrente. Na ausência de IgM, uma subida, de 4 vezes ou mais, num título de IgG inicialmente nulo ou muito baixo, obtido com um intervalo de pelo menos 2 a 4 semanas, sugere uma infecção primária. Adicionalmente, a determinação da avidéz das IgG, pode revelar se se trata de uma infecção recente ou antiga, sendo que na primeira os anticorpos têm um índice de avidéz ou afinidade baixo e na segunda, alto (Munro et al., 2005; Nasir, Babayo & Shehu, 2016).

2.11.2 Método de deteção de ácidos nucleicos

O método de deteção de ácidos nucleicos (em inglês, *Nucleic Acid Testing*, NAT) envolve a amplificação e deteção de material genético, nomeadamente ADN e ARN. Atualmente, esta é considerada a técnica mais sensível para diagnóstico de CMV, sendo por isso o método preferencial na maioria dos laboratórios. Este método tem por base a tecnologia de PCR que é capaz de detetar quantidade mínimas de material genético (Razonable, Paya & Smith, 2002).

O NAT pode ser qualitativo (positivo ou negativo) ou quantitativo (quantidade de vírus por unidade de volume). Apesar do método qualitativo de deteção de ADN ser muito sensível, não distingue o ADN proveniente de uma infecção latente, daquele proveniente da replicação viral ativa, o que não acontece com o método qualitativo de deteção de ARN, visto este detetar um produto intermédio da replicação do vírus. Ambos os métodos qualitativos são incapazes de quantificar a carga viral do CMV e por consequência é impossível avaliar a severidade da infecção a partir destes (uma carga viral elevada está normalmente associada a doença citomegálica, ao passo que uma carga viral baixa está tipicamente associada a uma infecção assintomática). Desta forma o método qualitativo tem uma utilidade bastante limitada no que diz respeito à monitorização da doença e da resposta à terapêutica. Em contrapartida, a utilização de métodos quantitativos de pesquisa de material genético permite estabelecer a correlação entre a sintomatologia e severidade da doença e o nível de replicação viral, isto porque um valor alto ou crescente de carga viral é preditivo de replicação ativa e um valor baixo pode ser indicativo de infecção latente (Razonable & Hayden, 2013). Para além de ser importante do ponto de vista do prognóstico, a NAT quantitativa tem outras utilidade clínicas (Dioverti & Razonable, 2015):

- Monitorização da resposta ao tratamento antiviral - uma descida elevada da carga viral no início da terapêutica está associada a tratamentos mais curtos, e vice-versa. Da mesma forma, uma carga viral elevada no momento do diagnóstico está associada a um tempo de resolução da doença mais longo e consequentemente a um período mais longo de tratamento;
- Estabelecimento de um diagnóstico rápido, altamente sensível e específico e que permita iniciar a terapêutica antiviral mais cedo;
- Orientação quanto ao início de terapêutica *preemptiva*, em doentes com infeção assintomática;
- Identificação de risco de doença recorrente – pela incapacidade de atingir cargas virais indetetáveis, ou pela diminuição pouco expressiva da mesma.
- Identificação de resistência à terapêutica – pela observação de um aumento ou uma não diminuição da carga viral durante a terapêutica antiviral.

O método de deteção de ADN citomegálico (e que tem como alvo determinados genes, tais como, o da ADN polimerase e o da glicoproteína B) é altamente sensível na deteção de ADN viral, conseguindo rapidamente detetar e quantificar pequenas quantidade de ADN viral. No que diz respeito ao método de deteção de ARN (que recorre à tecnologia de Transcriptase reversa-PCR, e que tem como alvo, por exemplo, o ARNm [ARN mensageiro] imediatamente precoce e ARNm pp67) este é menos sensível que o anterior (e por vezes, até menos sensível que a antigenémia), no entanto é um indicador mais específico de replicação viral ativa, visto a técnica anterior poder detetar ADN viral latente. A deteção de material genético em fase latente pode significar utilização desnecessária de terapêuticas antivirais. Em contrapartida, a molécula de ARN é rapidamente degradada, o que pode conduzir a falsos negativos, ao contrário da molécula de ADN que é altamente estável ao longo do tempo (Dioverti & Razonable, 2016; Lam et al., 1998; Mengoli et al., 2004).

O método de deteção de ácidos nucleicos pode utilizar uma grande variedade de amostras, tais como o sangue periférico (o mais utilizado, visto a infeção citomegálica levar a virémia), o humor aquoso e vítreo (utilizada para confirmação de retinite por CMV e subsequente monitorização da terapêutica), lavados bronco-alveolares (utilizado para confirmação de pneumonia por CMV, em doentes com sintomatologia compatível) líquido cefalorraquidiano (utilizado no diagnóstico de patologias do sistema nervoso

central, designadamente, encefalopatias, meningites e polirradiculopatia), urina e fezes (estas últimos 2 tipos de amostras não são recomendadas para diagnóstico de doença por CMV, dado o baixo valor preditivo positivo, excetuando o diagnóstico de infeção por CMV em crianças utilizando o método de deteção de ADN), entre outros (Razonable & Hayden, 2013; Sia & Patel, 2000).

O NAT que recorre a amostras de sangue periférico é altamente sensível, podendo ser utilizado para diagnóstico de doença por CMV, como orientador da terapia *preemptiva* e monitorização do tratamento antiviral. Para tal, podem ser utilizados diferentes tipos de compartimentos do sangue, nomeadamente, sangue total, preparações leucocitárias, plasma e soro, sendo que os 2 primeiros são os mais sensíveis para deteção de ADN citomegálico. Os valores de carga viral obtidos nos vários compartimentos têm uma boa correlação, com exceção da técnica que utiliza sangue total (único dos 4 compartimentos que não requer pré-processamento), que obtém valores mais elevados, refletindo a sua maior sensibilidade e capacidade de deteção de um baixo número de cópias de material genético (o que é uma vantagem, mas ao mesmo tempo uma desvantagem, visto poder levar a terapêuticas antivirais desnecessárias ou mais prolongadas). A utilização de plasma e soro tem vindo a ser recomendada como a mais indicativa e específica de infeção ativa por CMV em recetores de SOT, visto não contabilizar o material genético em fase latente contido nos leucócitos (Dioverti & Razonable, 2015; Razonable et al., 2002).

De entre as tecnologias de PCR disponíveis destaca-se o PCR em tempo real como sendo o mais utilizado, devido à maior exatidão, maior rapidez no tempo de resposta, menor risco de contaminação e maior eficiência, quando em comparação com o PCR convencional (Azevedo et al., 2015).

Atualmente, existe um grande número de métodos de deteção de ácidos nucleicos disponíveis, sendo a maioria desenvolvida pelos próprios laboratórios. A grande desvantagem destas técnicas *in house* é a variabilidade de resultados entre laboratórios, o que limita o estabelecimento de valores *threshold* que possam ser amplamente utilizados pelos clínicos na prevenção, diagnóstico, prognóstico e monitorização da terapêutica da doença por CMV (Pang et al., 2009). Isto acontece porque as diferentes técnicas variam no limite superior e inferior de deteção, na precisão, na exatidão, no método de extração, no gene alvo, nos primers, nas sondas, no método de deteção, na calibração, entre outros (Hayden et al., 2011). De forma a colmatar o problema da falta de standardização, em

2010 a Organização Mundial da Saúde (OMS), desenvolveu o primeiro padrão internacional para quantificação de ácidos nucleicos de CMV, que contém uma quantidade estandardizada de vírus, 5×10^6 UI/mL. Este padrão internacional veio não só uniformizar os resultados obtidos entre diferentes laboratórios, mas também permitir a avaliação, por parte dos laboratórios e fabricantes, da exatidão dos valores da carga viral (Fryer, Heath & Minor, 2016; Kotton et al., 2013). No entanto, apesar da utilização deste padrão internacional, as técnicas *in house* apresentam ainda outros fatores que podem fazer variar os resultados obtidos entre laboratórios, tais como, a eficiência do método de extração de ácidos nucleicos, os métodos bioquímicos de deteção, a eficiência do método de amplificação e variáveis dependentes do operador. Dada esta variabilidade, é recomendado que os laboratórios utilizem métodos comerciais (que disponibilizam todos os passos da técnica) calibrados pelo padrão da OMS, como o são, o teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan CMV e o teste artus CMV RGQ MDx, e que demonstram uma elevada concordância de resultados entre diferentes laboratórios, de forma a solucionar este problema. Em adição, os resultados deverão ser apresentados em UI/ml, para assim facilitar a comparação interlaboratórios (Dioverti & Razonable, 2015; Hirsch et al., 2013).

2.11.3 Antigenemia

A antigenemia, é um teste rápido e de simples execução, que consiste na deteção da fosfoproteína mais abundante no tegumento do CMV, a pp65, nos leucócitos infetados do sangue periférico (que deverá ser colhido com anticoagulantes), usando para tal técnicas de imunofluorescência ou técnicas imunoenzimáticas (como é a imunoperoxidase) (Dioverti & Razonable, 2016). Esta é uma técnica qualitativa e quantitativa, e como tal o resultado é expresso como sendo positivo ou negativo, e no total de células positivas pelo número de células contadas. Visto esta proteína ser secretada durante o período de replicação viral, a sua deteção está associada a infeção citomegálica ativa (Ross et al., 2011).

Este teste tem maior sensibilidade que os métodos de deteção de CMV em cultura celular, sendo capaz de detetar o vírus antes do método de cultura o conseguir. No entanto quando comparado com métodos moleculares revelam uma sensibilidade inferior (Ikewaki et al., 2003; van der Bij et al., 1988).

A detecção de células positivas na presença de sintomatologia confirma o diagnóstico de doença por CMV, sendo ainda possível correlacionar o maior número de células positivas com um maior grau de severidade da doença e maior risco de progressão para doença. Em adição, este método pode ser utilizado para orientação de início de terapêutica *preemptiva*, visto conseguir detetar antigenémia 5 a 14 dias antes do início da sintomatologia. Este método é ainda utilizado na orientação da terapêutica antiviral, visto o número de células positivas diminuir ao longo da terapêutica antiviral efetiva. Apesar desta diminuição, no número de células positivas, poder ser acompanhada de aumentos intermitentes nas primeiras 2 semanas de terapêutica, o que não significa necessariamente falha terapêutica, a menos que, a evolução clínica não se mantenha. A terapêutica é assim mantida até que seja atingido um nível definido ou não seja possível a detecção de antigenémia. No caso de se observar um aumento permanente do número de células positivas, é essencial considerar a possibilidade de resistência à terapêutica ou ponderar a diminuição da terapêutica imunossupressora (Razonable & Hayden, 2013).

Apesar das suas vantagens, a antigenémia tem muitas limitações, nomeadamente, quantificação subjetiva e dependente da experiência do operador, difícil padronização, comprometendo desta forma a reprodutibilidade entre laboratórios, baixa estabilidade da amostra (dada a dependência desta técnica em relação ao tempo de vida dos leucócitos *ex vivo*, é essencial o rápido processamento da amostra, idealmente até 6h após a sua colheita, de forma a aumentar a sensibilidade do método), e reduzida sensibilidade em doentes com uma contagem de leucócitos baixa (inferior a 1000 células/ μ L). Pelas desvantagens enumeradas acima, a maioria dos laboratórios acabam por preferir utilizar técnicas quantitativas de biologia molecular (Kwon, Jung, Ko, Lee & Cho, 2015; Ross, Novak, Pati & Boppana, 2011).

2.11.4 Cultura de células

A cultura de células é um método essencialmente utilizado no diagnóstico de infeção congénita e de doença tecido-invasiva (Kotton et al., 2013). Este método utiliza fibroblastos humanos como meio de cultura e tem como objetivo o isolamento do citomegalovírus. Pode utilizar como amostras, o sangue, as secreções respiratórias, a saliva, as fezes, o líquido cefalorraquidiano e amostras de biópsia de tecidos e pode ser dividido em cultura convencional ou clássica (menos utilizada) e cultura em “Shell Vial” (mais utilizada). O primeiro é um método tradicional de cultura em placa, em que a

deteção do CMV requer a identificação ao microscópio do efeito citopático característico deste vírus, processo que pode demorar entre 2 dias (no caso do doente ter um elevado título viral) a 6 semanas (no caso do doente ter um baixo título viral) a surgir. Aquando da utilização de amostras, que não a saliva, urina ou fezes, este é um método altamente específico para o diagnóstico de doença por CMV e preditivo para o risco de progresso da infeção citomegálica. No entanto em amostras de urina, saliva e fezes é clinicamente supérfluo e não recomendado (excetuando os indivíduos seronegativos para o CMV), isto porque o CMV pode ser excretado através destes, durante vários meses após a infeção aguda. Adicionalmente este é um método pouco sensível para CMV, particularmente quando é utilizado sangue como amostra. Em alternativa à cultura clássica é utilizada a cultura em “Shell Vial”, que tem por base a centrifugação a baixa velocidade e a deteção de antigénios imediatamente precoces, que são produzidos durante a replicação viral, recorrendo para tal a anticorpos monoclonais. Este método permite a obtenção de resultados em 48-72h, no entanto as limitações a respeito da sensibilidade e especificidade mantêm-se (Boeckh & Boivin, 1998; Razonable & Hayden, 2013).

Pelo motivos enumerados acima, o método de deteção de CMV em cultura de células tem sido amplamente substituído pela antigenémia e métodos de deteção de ácidos nucleicos (Boeckh & Boivin, 1998).

2.11.5 Histopatologia

É possível a deteção do CMV através da histopatologia, pela visualização de células infetadas pelo vírus (que apresentam como características principais, o aumento evidente do volume e a presença de inclusões intranucleares basófilas) em amostras de biópsia ou de citologia. Atualmente este continua a ser o método de referência para o diagnóstico de doença tecido-invasiva, por ser altamente específico. No entanto, devido à sua característica invasiva este processo é somente utilizado em determinadas situações clínicas, como o são, as suspeitas de rejeição de órgão, de coinfeção por outro patógeno (quando o tratamento não resolve a sintomatologia) ou de doença “compartimentalizada” (por ausência de virémia) (Coffin, Burak, Hart & Gao, 2006; Navaneethan, Venkatesh & Wang, 2011; Preiksaitis, Brennan, Fishman & Allen, 2005; Razonable & Hayden, 2013).

2.12 Terapêutica antiviral para o CMV

Atualmente, a terapêutica antiviral direcionada para o CMV, é essencialmente utilizada nos indivíduos imunocomprometidos, isto porque nos indivíduos imunocompetentes a resolução da infecção citomegálica acontece naturalmente, sem que seja necessária intervenção terapêutica (Lurain & Chou, 2010).

2.12.1 Tratamento

Estão disponíveis para tratamento da doença por CMV, quatro fármacos antivirais, Ganciclovir (inibidor competitivo da ADN polimerase viral, análogo da guanosina), Foscarnet (inibidor da replicação viral; é utilizado como alternativa em caso de resistência ao ganciclovir), Cidofovir (análogo nucleótido, aprovado para a retinite por CMV) e Valganciclovir, sendo este último um profármaco do ganciclovir. Atualmente o tratamento de primeira linha é o ganciclovir intravenoso (Akhter & Wills, 2017; Lurain & Chou, 2010).

2.12.1.1 Tratamento no indivíduo transplantado

O tratamento com ganciclovir intravenoso nos indivíduos sujeitos a transplante está indicado na síndrome viral, na presença de doença citomegálica e sempre que sejam identificados dano num órgão ou tecido. Em alternativa poderá ser administrado *per os* valganciclovir nas doenças menos graves e quando não existe compromisso da absorção gastrointestinal (Åsberg et al., 2007).

A duração da terapêutica é definida pela monitorização semanal da carga viral e o término da mesma só deverá ter lugar aquando da erradicação viral em 1 ou 2 determinações, devendo ter uma duração mínima de 2 semanas. São diversos os fatores risco associados a uma terapêutica antiviral prolongada, nomeadamente, virémia elevado no início do tratamento e doença citomegálica recorrente (Azevedo et al., 2015).

Em adição poderá igualmente ser ponderada a redução prudente da terapêutica imunossupressora, de forma a permitir uma resposta imunitária por parte do hospedeiro (Ramanan & Razonable, 2013).

2.12.2 Prevenção (profilaxia antiviral e tratamento *preemptivo*)

Dada a inexistência de uma vacina específica contra o CMV, a prevenção da infecção por este vírus passa pela utilização de profilaxia ou de tratamento *preemptivo*, de forma

a reduzir os efeitos indiretos associados à replicação viral, reduzir a mortalidade associada ao CMV e diminuir a incidência de doença por CMV. Ambas as terapêuticas são eficazes, não existindo consenso sobre qual a melhor opção. Em alguns centros é inclusive utilizada uma estratégia híbrida, onde se opta pela profilaxia em períodos de maior risco de doença, e pelo tratamento *preemptivo* em momentos de menor risco (Kotton et al., 2013).

2.12.2.1 Profilaxia Antiviral

Esta estratégia envolve a administração de terapêutica antiviral (preferencialmente valganciclovir *per os*, no entanto, este tem um elevado custo e frequentemente o clínico opta pela administração de ganciclovir IV) a todos os indivíduos em risco de infeção por CMV (isto é no SOT, o status serológico D+/R-) habitualmente entre o 10º dia que antecede e o 3º ou 6º mês que procede o transplante, podendo este período variar em função do tipo de transplante (maior duração de profilaxia em recetores de transplante de pulmão) e do *status* serológico do recetor. Esta estratégia tem como principais vantagens, a facilidade de orientação da terapêutica, a diminuição da incidência de efeitos indiretos relacionados com o CMV (tais como, as infeções oportunistas, a rejeição do enxerto e a mortalidade) e a proteção contra outro herpesvírus. Em contrapartida, as principais desvantagens são, a elevada toxicidade dos fármacos (essencialmente, leucopenia e neutropenia), a maior incidência de doença tardia após terminar o tratamento, o aumento das resistências aos antivíricos, a baixa estimulação imunitária, o que explica em parte a elevada incidência de doença tardia, e o custo elevado da terapêutica (Azevedo et al., 2015; Dioverti & Razonable, 2015; Ramanan & Razonable, 2013; Snyderman, Torres-Madriz & Boucher, 2008).

2.12.2.2 Tratamento *preemptivo*

Esta estratégia preventiva envolve a monitorização semanal destes doentes, habitualmente, durante um período de 3 meses após o transplante, recorrendo, para tal, a métodos quantitativos de deteção de ácido nucleicos e de deteção de antigenémia. Aquando da deteção de um resultado positivo é iniciada terapêutica, permitindo assim um controlo precoce da infeção e consequente prevenção da doença por CMV. Após a confirmação de um resultado negativo a terapêutica é suspensa (Kotton et al., 2013).

O valor *threshold* considerado positivo, em ambas as técnicas, depende da condição imunitária do doente (*status* sorológico e da intensidade da imunossupressão) e do tipo

de transplante, e por esta razão não existe aqui também um consenso. Neste contexto, é essencial ter em atenção que assumir um valor de *threshold* muito baixo e próximo do limite de deteção, pode levar a tratamentos desnecessários, especialmente em indivíduos seropositivos. Caso este valor seja muito elevado, pode levar ao aumento da morbilidade e diminuição da sobrevivência do recetor (Dioverti & Razonable, 2015; Razonable & Hayden, 2013).

Esta abordagem tem como vantagens, a baixa toxicidade e custo farmacológico e a reduzida incidência de doença tardia, o que é em parte explicado pela estimulação imunitária a que estes indivíduos estão expostos (níveis baixos de virémia). Como desvantagens, esta estratégia apresenta um elevado custo laboratorial, está associado a um maior complexidade na instituição da terapêutica, não confere proteção contra outros herpesvírus, e por este motivo não se verifica uma diminuição da incidência de efeitos indiretos relacionados com o CMV, aumenta as resistências aos antivíricos e aumenta a possibilidade de evolução para doença tecido-invasiva em caso de falha na monitorização semanal destes doentes (Dioverti & Razonable, 2015; Ramanan & Razonable, 2013).

2.13 Resistência Viral

Apesar de incomuns, as resistências virais têm sido associadas ao aumento da morbilidade e mortalidade nos recetores transplante de órgão sólido. São diversos os fatores de risco associados à resistência aos fármacos utilizados contra o CMV, nomeadamente, exposição prolongada a terapêutica antivírica na presença de replicação viral, recetor seronegativo de dador seropositivo (D+/R-), longos períodos de profilaxia oral de baixa-dose, doses elevadas de terapia imunossupressora e doses inadequadas de antivíricos. Fatores que levantam suspeitas em relação a resistência viral incluem, presença de cargas virais persistentes ou crescentes na presença de profilaxia antiviral, assim como, replicação viral ativa e ou progressão clínica após a 2-3ª semana de tratamento (Azevedo et al., 2015; Chou, 2015; Dioverti & Razonable, 2015; López-Aladid et al., 2017).

Todos os casos suspeitos de resistência viral deverão ser confirmados através de diagnósticos laboratoriais, que analisam o genótipo viral (nomeadamente os genes UL97 e UL54, para deteção de resistências ao ganciclovir) através de amostras de sangue ou plasma. Em caso de resistência ao ganciclovir de baixo nível, no gene UL97, deverá ser aumentada a sua dose diária, pelo contrário se esta resistência viral se revelar de alto nível,

o antivírico Foscarnet deverá ser utilizado como alternativa. Deverá ainda ser ponderada a diminuição da terapêutica imunossupressora, de forma a otimizar a resposta imunitária do hospedeiro (Chou, 2015; Razonable & Humar, 2013).

2.14 Referências Bibliográficas

- Ahlqvist, J., & Mocarski, E. (2011). Cytomegalovirus UL103 Controls Virion and Dense Body Egress. *Journal of Virology*, 85(10), 5125–5135. <https://doi.org/10.1128/JVI.01682-10>
- Akhter, K., & Wills, T. (2017). Cytomegalovirus Medication: Antivirals, Immune Globulin, Antimetabolite. Retrieved November 7, 2017, from <https://emedicine.medscape.com/article/215702-medication#2>
- Ariza-Heredia, E. J., Nesher, L., & Chemaly, R. F. (2014). Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: A mini-review. *Cancer Letters*, 342(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.09.004>
- Åsberg, A., Humar, A., Rollag, H., Jardine, A. G., Mouas, H., Pescovitz, M. D., ... Hartmann, A. (2007). Oral Valganciclovir Is Noninferior to Intravenous Ganciclovir for the Treatment of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*, 7(9), 2106–2113. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.01910.x>
- Azevedo, L. S., Pierrotti, L. C., Abdala, E., Costa, S. F., Strabelli, T. M. V., Campos, S. V., ... Marques, H. H. de S. (2015). Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clinics*, 70(7), 515–523. [https://doi.org/10.6061/clinics/2015\(07\)09](https://doi.org/10.6061/clinics/2015(07)09)
- Balfour, H. H. (1979). The Troll of Transplantation. *Archives of Internal Medicine*, 139(3), 279–280. <https://doi.org/10.1001/archinte.1979.03630400011006>
- Beam, E., & Razonable, R. R. (2012). Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation: Epidemiology, Prevention, and Treatment. *Current Infectious Disease Reports*, 14(6), 633–641. <https://doi.org/10.1007/s11908-012-0292-2>
- Boeckh, M., & Boivin, G. (1998). Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 533–554. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665982>
- Boeckh, M., & Geballe, A. P. (2011). Cytomegalovirus : pathogen , paradigm , and puzzle. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(5), 1673–1680. <https://doi.org/10.1172/JCI45449>

- Boeckh, M., Nichols, W. G., Papanicolaou, G., Rubin, R., Wingard, J. R., & Zaia, J. (2003). Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 9(9), 543–558. [https://doi.org/10.1016/S1083-8791\(03\)00287-8](https://doi.org/10.1016/S1083-8791(03)00287-8)
- Boehme, K. W., Guerrero, M., & Compton, T. (2006). Human Cytomegalovirus Envelope Glycoproteins B and H Are Necessary for TLR2 Activation in Permissive Cells. *The Journal of Immunology*, 177(10), 7094–7102. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7094>
- Boehme, K. W., Singh, J., Perry, S. T., & Compton, T. (2004). Human Cytomegalovirus Elicits a Coordinated Cellular Antiviral Response via Envelope Glycoprotein B. *Journal of Virology*, 78(3), 1202–1211. [https://doi.org/10.1128/JVI.78.3.1202–1211.2004](https://doi.org/10.1128/JVI.78.3.1202-1211.2004)
- Britt, W. J., Vugler, L., Butfiloski, E. J., & Stephens, E. B. (1990). Cell Surface Expression of Human Cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): Use of HCMV-Recombinant Vaccinia Virus-Infected Cells in Analysis of the Human Neutralizing Antibody Response. *Journal of Virology*, 64(3), 1079–1085. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC249220/pdf/jvirol00058-0125.pdf>
- Bruggeman, C. A., Debie, W. M. H., Grauls, G., & van Boven, C. P. A. (1986). Cytomegalovirus Infection of Rat Endothelial Cells in vitro. *Archives of Virology*, 87(3–4), 265–272. <https://doi.org/10.1007/BF01315304>
- Butcher, S. J., Aitken, J., Mitchell, J., Gowen, B., & Dargan, D. J. (1998). Structure of the Human Cytomegalovirus B Capsid by Electron Cryomicroscopy and Image Reconstruction. *Journal of Structural Biology*, 124(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4055>
- Cannon, M. J., Hyde, T. B., & Schmid, D. S. (2011). Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection. *Reviews in Medical Virology*, 21(4), 240–255. <https://doi.org/10.1002/rmv.695>
- Cannon, M. J., Schmid, D. S., & Hyde, T. B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in Medical Virology*, 20(4), 202–213. <https://doi.org/10.1002/rmv.655>

- Carbone, J. (2016). The Immunology of Posttransplant CMV Infection: Potential Effect of CMV Immunoglobulins on Distinct Components of the Immune Response to CMV. *Transplantation*, 100(3), S11–S18. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001095>
- Cariani, E., Pollara, C. P., Valloncini, B., Perandin, F., Bonfanti, C., & Manca, N. (2007). Relationship between pp65 antigenemia levels and real-time quantitative DNA PCR for Human Cytomegalovirus (HCMV) management in immunocompromised patients. *BMC Infectious Diseases*, 7(1), 138. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-138>
- Carmona, M., Álvarez, M., Marco, J., Mahillo, B., Domínguez-Gil, B., Núñez, J. R., & Matesanz, R. (2017). Global Organ Transplant Activities in 2015. Data from the Global Observatory on Donation and Transplantation (GODT). *Transplantation*, 101, S29. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000525015.43613.75>
- Chaer, F. El, Shah, D. P., & Chemaly, R. F. (2016). How I Treat How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood*, 128(23), 2624–2636. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-688432>
- Chambers, J., Angulo, A., Amaratunga, D., Guo, H., Jiang, Y., Wan, J. S., ... Ghazal, P. (1999). DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. *Journal of Virology*, 73(7), 5757–5766. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364327>
- Chou, S. (2015). Approach to drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 28(4), 293–299. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000170>
- Coffin, C. S., Burak, K. W., Hart, J., & Gao, Z. (2006). The impact of pathologist experience on liver transplant biopsy interpretation. *Modern Pathology*, 19(6), 832–838. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800605>
- Coleman, S., Hornig, J., Maddux, S., Choi, K. Y., & McGregor, A. (2015). Viral Glycoprotein Complex Formation, Essential Function and Immunogenicity in the Guinea Pig Model for Cytomegalovirus. *PLOS One*, 10(8), 1–33. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135567>

- Committee for medicinal products for human use. (2008). *Guideline on clinical investigation of immunosuppressants for solid organ transplantation*. Retrieved from <http://www.emea.europa.eu>
- Compton, T., Kurt-Jones, E. a., Boehme, K. W., Belko, J., Latz, E., Golenbock, D. T., & Finberg, R. W. (2003). Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *Journal of Virology*, 77(8), 4588–4596. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.8.4588>
- Crough, T., & Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 76–98. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-08>
- Dai, X., Yu, X., Gong, H., Jiang, X., Abenes, G., Liu, H., ... Zhou, Z. H. (2013). The Smallest Capsid Protein Mediates Binding of the Essential Tegument Protein pp150 to Stabilize DNA-Containing Capsids in Human Cytomegalovirus. *PLOS Pathogens*, 9(8), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003525>
- Davison, A. J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D. J., Alcendor, D. J., ... Hayward, G. S. (2003). The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *Journal of General Virology*, 84(1), 17–28. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18606-0>
- de la Cámara, R. (2016). CMV in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2016.031>
- Dioverti, M. V., & Razonable, R. R. (2016). Cytomegalovirus. *Microbiology Spectrum*, 4(4), 1–26. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0022-2015>
- Dioverti, M. V., & Razonable, R. R. (2015). Clinical utility of cytomegalovirus viral load in solid organ transplant recipients. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 28(4), 317–322. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000173>
- Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R. D., Hassan-Walker, A. F., Lee, L., Addison, C., ... Davison, A. J. (2004). Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *Journal of General Virology*, 85(5), 1301–1312.

<https://doi.org/10.1099/vir.0.79888-0>

- Dollard, S. C., Grosse, S. D., & Ross, D. S. (2007). New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Reviews in Medical Virology*, 17(5), 355–363. <https://doi.org/10.1002/rmv.544>
- Drew, W. L. (1992). Nonpulmonary manifestations of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(2), 204–210. <https://doi.org/10.1128/CMR.5.2.204>
- Eddleston, M., Peacock, S., Juniper, M., & Warrell, D. A. (1997). Severe Cytomegalovirus Infection in Immunocompetent Patients. *Clinical Infectious Diseases*, 24(1), 52–56. <https://doi.org/10.1093/clinids/24.1.52>
- Edinur, H. A., Manaf, S. M., & Che Mat, N. F. (2016). Genetic barriers in transplantation medicine. *World Journal of Transplantation*, 6(3), 532–541. <https://doi.org/10.5500/wjt.v6.i3.532>
- Eid, A. J., & Razonable, R. R. (2010). New Developments in the Management of Cytomegalovirus Infection after Solid Organ Transplantation. *Drugs*, 70(8), 965–981. <https://doi.org/10.2165/10898540-000000000-00000>
- El Sanousi, S. M., Osman, Z. A., Mohamed, A. B. S., Al Awfi, M. S. H., Babair, Y. H., & Babair, M. H. (2016). Comparison of Real-time PCR versus ELISA in the diagnosis of cytomegalovirus infection in pregnant women. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1(3), 67–69. <https://doi.org/10.15761/CMID.1000114>
- Feng, S., Yang, J., Wang, W., Hu, X., Liu, H., Qian, X., ... Zhang, X. (2016). Incidence and Risk Factors for Cytomegalovirus Infection in Patients With Kidney Transplantation: A Single-Center Experience. *Transplantation Proceedings*, 48(8), 2695–2699. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2016.08.015>
- Fishman, J., Emery, V., Freeman, R., Pascual, M., Rostaing, L., Schlitt, H., ... Uknis, M. (2007). Cytomegalovirus in transplantation – challenging the status quo. *Clinical Transplantation*, 21(2), 149–158. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2006.00618.x>

- Fraser, G. A. M., Walker, I. I., & Canadian Blood and Marrow Transplant Group. (2004). Cytomegalovirus Prophylaxis and Treatment after Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Canada: A Description of Current Practices and Comparison with Centers for Disease Control/Infectious Diseases Society of America/American Society for Blood and Mar. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 10(5), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2003.10.007>
- Fryer, J. F., Heath, A. B., & Minor, P. D. (2016). A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus for nucleic acid amplification technology. *Biologicals*, 44(4), 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.04.005>
- Futohi, F., Saber, A., Nemati, E., Einollahi, B., & Rostami, Z. (2015). Human Leukocyte Antigen Alleles and Cytomegalovirus Infection After Renal Transplantation. *Nephro-Urology Monthly*, 7(6), 1–7. <https://doi.org/10.5812/numonthly.31635>
- Gamadia, L. E., Remmerswaal, E. B. M., Weel, J. F., Bemelman, F., Van Lier, R. A. W., & Berge, I. J. M. Ten. (2003). Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN—producing CD4 T cells in protection against CMV disease. *Blood*, 101(7), 2686–2692. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2502>
- Gandhi, M. K., & Khanna, R. (2004). Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(12), 725–738. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01202-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01202-2)
- Goderis, J., De Leenheer, E., Smets, K., Van Hoecke, H., Keymeulen, A., & Dhooze, I. (2014). Hearing loss and congenital CMV infection: a systematic review. *Pediatrics*, 134(5), 972–982. <https://doi.org/10.1542/peds.2014-1173>
- Gómez-Mora, E., García, E., Urrea, V., Massanella, M., Puig, J., Negrodo, E., ... Cabrera, C. (2017). Preserved immune functionality and high CMV-specific T-cell responses in HIV-infected individuals with poor CD4 T-cell immune recovery. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12013-2>
- Griffiths, P. D. (2006). CMV as a cofactor enhancing progression of AIDS. *Journal of Clinical Virology*, 35(4), 489–492. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.10.016>

- Hayashi, S., Kimura, H., Oshiro, M., Kato, Y., Yasuda, A., Suzuki, C., ... Hayakawa, M. (2011). Transmission of cytomegalovirus via breast milk in extremely premature infants. *Journal of Perinatology*, 31(10), 440–445. <https://doi.org/10.1038/jp.2010.150>
- Hayden, R. T., Yan, X., Wick, M. T., Rodriguez, A. B., Xiong, X., Ginocchio, C. C., ... Caliendo, A. M. (2011). Factors contributing to variability of quantitative viral PCR results in proficiency testing samples: a multivariate analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(2), 337–345. <https://doi.org/10.1128/JCM.01287-11>
- Hirsch, H. H., Lautenschlager, I., Pinsky, B. A., Cardenoso, L., Aslam, S., Cobb, B., ... Valsamakis, A. (2013). An International Multicenter Performance Analysis of Cytomegalovirus Load Tests. *Clinical Infectious Diseases*, 56(3), 367–373. <https://doi.org/10.1093/cid/cis900>
- Ho, M. (2008). The history of cytomegalovirus and its diseases. *Medical Microbiology and Immunology*, 197(2), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s00430-007-0066-x>
- Horta, A., Leça, A., Margarida Alexandrino, A., Ângelo, H., Carapau, J., Marques, L., ... Ventura, T. (2007). *Protocolos de Diagnóstico e Terapêutica em Infecçiology Perinatal*. Portugal. Disponível em http://www.spp.pt/UserFiles/File/Infecçiology_Perinatal_2007/Infecçiology_Perinatal.pdf
- Hughes, B. L., & Gyamfi-Bannerman, C. (2016). Diagnosis and antenatal management of congenital cytomegalovirus infection. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 214(6), B5–B11. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.02.042>
- Humar, A., & Michaels, M. (2006). American Society of Transplantation Recommendations for Screening, Monitoring and Reporting of Infectious Complications in Immunosuppression Trials in Recipients of Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 6(2), 262–274. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01207.x>
- Ikewaki, J., Ohtsuka, E., Kawano, R., Ogata, M., Kikuchi, H., & Nasu, M. (2003). Real-time PCR assay compared to nested PCR and antigenemia assays for detecting cytomegalovirus reactivation in adult T-cell leukemia-lymphoma patients. *Journal*

of Clinical Microbiology, 41(9), 4382–4387.
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4382-4387.2003>

International Committee on Taxonomy of Viruses. (2016). Acedido a 8 novembro de 2017, disponível em <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

Jackson, S. E., Redeker, A., Arens, R., van Baarle, D., van den Berg, S. P. H., Benedict, C. A., ... Wills, M. R. (2017). CMV immune evasion and manipulation of the immune system with aging. *GeroScience*, 39(3), 273–291.
<https://doi.org/10.1007/s11357-017-9986-6>

Jacobsohn, D. A., & Vogelsang, G. B. (2007). Acute graft versus host disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2(35), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-35>

Jaskula, E., Bochenska, J., Kocwin, E., Tarnowska, A., & Lange, A. (2012). CMV Serostatus of Donor-Recipient Pairs Influences the Risk of CMV Infection/Reactivation in HSCT Patients. *Bone Marrow Research*, 2012, 1–8.
<https://doi.org/10.1155/2012/375075>

Jean Beltran, P. M., & Cristea, I. M. (2014). The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Review of Proteomics*, 11(6), 697–711. <https://doi.org/10.1586/14789450.2014.971116>

Jonjic, S., Pavic, I., Polic, B., Crnkovic, I., Lucin, P., & Koszinowski, U. H. (1994). Antibodies Are Not Essential for the Resolution of Primary Cytomegalovirus Infection but Limit Dissemination of Recurrent Virus. *The Journal of Experimental Medicine*, 179(5), 1713–1717. <https://doi.org/10.1084/jem.179.5.1713>

Joseph, S. A., Béliveau, C., Muecke, C. J., Rahme, E., Soto, J. C., Flowerdew, G., ... Gyorkos, T. W. (2006). Cytomegalovirus as an occupational risk in daycare educators. *Paediatrics & Child Health*, 11(7), 401–407. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19030309>

Kalejta, R. F. (2008). Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), 249–265.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-07>

- Karavellas, M. P., Plummer, D. J., Macdonald, J. C., Torriani, F. J., Shufelt, C. L., Azen, S. P., & Freeman, W. R. (1999). Incidence of Immune Recovery Vitritis in Cytomegalovirus Retinitis Patients following Institution of Successful Highly Active Antiretroviral Therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(3), 697–700. <https://doi.org/10.1086/314639>
- Kenneson, A., & Cannon, M. J. (2007). Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Reviews in Medical Virology*, 17(4), 253–276. <https://doi.org/10.1002/rmv.535>
- Keskin, N., Cakmak, S., & Tamam, L. (2017). Liver Transplantation in a Paranoid Schizophrenic Patient: A Case Report. *Acta Psychopathol*, 3(3), 1–3. <https://doi.org/10.4172/2469-6676.100102>
- Khan, N. (2007). The immunological burden of human cytomegalovirus infection. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 55(5), 299–308. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0037-3>
- Kim, C. S. (2010). Congenital and perinatal cytomegalovirus infection. *Korean Journal of Pediatrics*, 53(1), 14–20. <https://doi.org/10.3345/kjp.2010.53.1.14>
- Kim, J., Kim, A.-R., & Shin, E.-C. (2015). Cytomegalovirus Infection and Memory T Cell Inflation. *Immune Network*, 15(4), 186–90. <https://doi.org/10.4110/in.2015.15.4.186>
- Kotton, C. N., Kumar, D., Caliendo, A. M., Asberg, A., Chou, S., Danziger-Isakov, L., & Humar, A. (2013). Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation Journal*, 96(4), 333–360. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31829df29d>
- Kutza, A. S. T., Muhl, E., Hackstein, H., Kirchner, H., & Bein, G. (1998). High Incidence of Active Cytomegalovirus Infection Among Septic Patients. *Clinical Infectious Diseases*, 26(5), 1076–1082. <https://doi.org/10.1086/520307>
- Kwon, S., Jung, B. K., Ko, S. Y., Lee, C. K., & Cho, Y. (2015). Comparison of quantitation of cytomegalovirus DNA by real-time PCR in whole blood with the cytomegalovirus antigenemia assay. *Annals of Laboratory Medicine*, 35(1), 99–104.

<https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.1.99>

- L'Huillier, A. G., & Kumar, D. (2015). Immunizations in solid organ and hematopoietic stem cell transplant patients: A comprehensive review. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11(12), 2852–2863. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1078043>
- La Rosa, C., & Diamond, D. J. (2012). The immune response to human CMV. *Future Virology*, 7(3), 279–293. <https://doi.org/10.2217/fvl.12.8>
- Lam, K. M., Oldenburg, N., Khan, M. A., Gaylore, V., Mikhail, G. W., Strouhal, P. D., ... Yacoub, M. (1998). Significance of reverse transcription polymerase chain reaction in the detection of human cytomegalovirus gene transcripts in thoracic organ transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation*, 17(6), 555–565. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9662090>
- Lau, B., Poole, E., Krishna, B., Sellart, I., Wills, M. R., Murphy, E., & Sinclair, J. (2016). The Expression of Human Cytomegalovirus MicroRNA MiR-UL148D during Latent Infection in Primary Myeloid Cells Inhibits Activin A-triggered Secretion of IL-6. *Scientific Reports*, 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep31205>
- Lazzarotto, T., Guerra, B., Gabrielli, L., Lanari, M., & Landini, M. P. (2011). Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(9), 1285–1293. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03564.x>
- Ljungman, P. (2007). Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Viral status. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 20(2), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2006.09.003>
- Ljungman, P., Brand, R., Einsele, H., Frassoni, F., Niederwieser, D., Cordonnier, C., ... Cornelissen, J. J. (2003). Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood*, 102(13), 4255–4260. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3263>

- Ljungman, P., Griffiths, P., & Paya, C. (2002). Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 34(8), 1094–1097. <https://doi.org/10.1086/339329>
- Ljungman, P., Hakki, M., & Boeckh, M. (2011). Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Hematology/oncology Clinics of North America*, 25(1), 151–169. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2010.11.011>
- López-Aladid, R., Guiu, A., Sanclemente, G., López-Medrano, F., Cofán, F., Mar Mosquera, M., ... MAngeles, M. (2017). Detection of cytomegalovirus drug resistance mutations in solid organ transplant recipients with suspected resistance. *Journal of Clinical Virology*, 90, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.03.014>
- Lopo, S., Vinagre, E., & Palminha, P. (2004). “*Vírus citomegalo*” *Avaliação do programa nacional de vacinação. 2º Inquérito serológico nacional- Portugal Continental, 2001-2002*. Lisboa.
- Ludwig, A., & Hengel, H. (2009). Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Eurosurveillance*, 14(9), 1–7. Disponível em <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19140>
- Lumbreras, C., Manuel, O., Len, O., ten Berge, I. J. M., Sgarabotto, D., & Hirsch, H. H. (2014). Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(7), 19–26. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12594>
- Lurain, N. S., & Chou, S. (2010). Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(4), 689–712. <https://doi.org/10.1128/CMR.00009-10>
- Luscalov, S., Loga, L., Dican, L., & Junie, L. M. (2016). Cytomegalovirus Infection in Immunosuppressed Patients After Kidney Transplantation. *Clujul Medical*, 89(3), 343–346. <https://doi.org/10.15386/cjmed-587>
- Makker, J., Bajantri, B., Sakam, S., & Chilimuri, S. (2016). Cytomegalovirus related fatal duodenal diverticular bleeding: Case report and literature review. *World Journal Gastroenterology*, 22(31), 7166–7174. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i31.7166>

- Malm, G., & Engman, M.-L. (2007). Congenital cytomegalovirus infections. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 12(3), 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2007.01.012>
- Marsico, C., & Kimberlin, D. W. (2017). Congenital Cytomegalovirus infection : advances and challenges in diagnosis , prevention and treatment. *Italian Journal of Pediatrics*, 43(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13052-017-0358-8>
- Mengoli, C., Cusinato, R., Biasolo, M. A., Cesaro, S., Parolin, C., & Palù, G. (2004). Assessment of CMV load in solid organ transplant recipients by pp65 antigenemia and real-time quantitative DNA PCR assay: Correlation with pp67 RNA detection. *Journal of Medical Virology*, 74(1), 78–84. <https://doi.org/10.1002/jmv.20149>
- Mor, G., & Cardenas, I. (2010). The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(6), 425–433. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x>
- Munro, S. C., Hall, B., Whybin, L. R., Leader, L., Robertson, P., Maine, G. T., & Rawlinson, W. D. (2005). Diagnosis of and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4713–4718. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4713-4718.2005>
- Murphy, E., Yu, D., Grimwood, J., Schmutz, J., Dickson, M., Jarvis, M. A., ... Shenk, T. E. (2003). Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), 14976–14981. <https://doi.org/10.1073/pnas.2136652100>
- Nasir, I. A., Babayo, A., & Shehu, M. S. (2016). Clinical Significance of IgG Avidity Testing and Other Considerations in the Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection: A Review Update. *Medical Sciences*, 4(5), 1–11. <https://doi.org/10.3390/medsci4010005>
- Navaneethan, U., Venkatesh, P. G. K., & Wang, J. (2011). Cytomegalovirus ileitis in a patient after liver transplantation-differentiating from de novo IBD. *Journal of Crohn's and Colitis*, 5(4), 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2011.01.010>

- Niederwieser, D., Baldomero, H., Szer, J., Gratwohl, M., Aljurf, M., Atsuta, Y., ... Gratwohl, A. (2016). Hematopoietic Stem Cell Transplantation Activity Worldwide in 2012 and a SWOT Analysis of the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Group (WBMT) including the global survey. *Bone Marrow Transplant*, 51(6), 778–785. <https://doi.org/10.1038/bmt.2016.18>
- Palella, F. J., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., ... Investigators, the H. O. S. (1998). Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *New England Journal of Medicine*, 338(13), 853–860. <https://doi.org/10.1056/NEJM199803263381301>
- Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. (2017). Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents. Acedido a 28 de setembro de 2017, disponível em https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adult_oi.pdf
- Pang, X. L., Fox, J. D., Fenton, J. M., Miller, G. G., Caliendo, A. M., & Preiksaitis, J. K. (2009). Interlaboratory Comparison of Cytomegalovirus Viral Load Assays. *American Journal of Transplantation*, 9(2), 258–268. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02513.x>
- Pass, R. F., & Anderson, B. (2014). Mother-to-Child Transmission of Cytomegalovirus and Prevention of Congenital Infection. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 3(1), S2–S6. <https://doi.org/10.1093/jpids/piu069>
- Perumbeti, A. (2016). Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Acedido a 8 de novembro de 2017, disponível em <https://emedicine.medscape.com/article/208954-overview>
- Pourghesari, B., Khan, N., Best, D., Bruton, R., Nayak, L., & Moss, P. A. H. (2007). The cytomegalovirus-specific CD4+ T-cell response expands with age and markedly alters the CD4+ T-cell repertoire. *Journal of Virology*, 81(14), 7759–7765. <https://doi.org/10.1128/JVI.01262-06>
- Preiksaitis, J. K., Brennan, D. C., Fishman, J., & Allen, U. (2005). Canadian society of transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management in solid organ

- transplantation final report. *American Journal of Transplantation*, 5(2), 218–227. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00692.x>
- Preiksaitis, J. K., Sandhu, J., & Strautman, M. (2002). The risk of transfusion-acquired CMV infection in seronegative solid-organ transplant recipients receiving non-WBC-reduced blood components not screened for CMV antibody (1984 to 1996): experience at a single Canadian center. *Transfusion*, 42(4), 396–402. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1438.2002.00069.x>
- Prösch, S., Wendt, C. E. C., Reinke, P., Priemer, C., Oppert, M., Krüger, D. H., ... Döcke, W.-D. (2000). A Novel Link between Stress and Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection: Sympathetic Hyperactivity Stimulates HCMV Activation. *Virology*, 272(2), 357–365. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0367>
- Puchhammer-Stockl, E., & Gorzer, I. (2011). Human cytomegalovirus: an enormous variety of strains and their possible clinical significance in the human host. *Future Virology*, 6(2), 259–271. <https://doi.org/10.2217/fvl.10.87>
- Ramanan, P., & Razonable, R. R. (2013). Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation: a review. *Infection & Chemotherapy*, 45(3), 260–271. <https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.3.260>
- Razonable, R. R. (2013). Management strategies for cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients. *Infectious Disease Clinics of North America*, 27(2), 317–342. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.02.005>
- Razonable, R. R., Brown, R. A., Wilson, J., Groettum, C., Kremers, W., Espy, M., ... Paya, C. V. (2002). The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation*, 73(6), 968–973. Disponível em http://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2002/03270/The_clinical_use_of_various_blood_compartments_for.25.aspx
- Razonable, R. R., & Hayden, R. T. (2013). Clinical utility of viral load in management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 703–727. <https://doi.org/10.1128/CMR.00015-13>

- Razonable, R. R., & Humar, A. (2013). Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 13(s4), 93–106. <https://doi.org/10.1111/ajt.12103>
- Razonable, R. R., Paya, C. V., & Smith, T. F. (2002). Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), 746–752. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.3.746-752.2002>
- Reddehase, M. J. (2015). Margaret Gladys Smith, mother of cytomegalovirus: 60th anniversary of cytomegalovirus isolation. *Medical Microbiology and Immunology*, 204(3), 239–241. <https://doi.org/10.1007/s00430-015-0416-z>
- Renzette, N., Gibson, L., Jensen, J. D., & Kowalik, T. F. (2014). Human cytomegalovirus intrahost evolution-a new avenue for understanding and controlling herpesvirus infections. *Current Opinion in Virology*, 8, 109–15. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.08.001>
- Renzette, N., Pokalyuk, C., Gibson, L., Bhattacharjee, B., Schleiss, M. R., Hamprecht, K., ... Kowalik, T. F. (2015). Limits and patterns of cytomegalovirus genomic diversity in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(30), E4120–E4128. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501880112>
- Revello, M. G., & Gerna, G. (2004). Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Virology*, 29(2), 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2003.09.012>
- Revello, M. G., Zavattoni, M., Sarasini, A., Percivalle, E., Simoncini, L., & Gerna, G. (1998). Human Cytomegalovirus in Blood of Immunocompetent Persons during Primary Infection: Prognostic Implications for Pregnancy. *The Journal of Infectious Diseases*, 177(5), 1170–1175. <https://doi.org/10.1086/515277>
- Roman, A., Manito, N., Campistol, J. M., Cuervas-Mons, V., Almenar, L., Arias, M., ... Ussetti, P. (2014). The impact of the prevention strategies on the indirect effects of CMV infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation Reviews*, 28(2), 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2014.01.001>

- Rosa, C. La, & Diamond, D. J. (2012). The immune response to human CMV. *Future Virology*, 7(3), 279–293. <https://doi.org/10.2217/fvl.12.8>.
- Ross, D. S., Dollard, S. C., Victor, M., Sumartojo, E., & Cannon, M. J. (2006). The Epidemiology and Prevention of Congenital Cytomegalovirus Infection and Disease: Activities of the Centers for Disease Control and Prevention Workgroup. *Journal of Women's Health*, 15(3), 224–229. <https://doi.org/10.1089/jwh.2006.15.224>
- Ross, S. A., Ahmed, A., Palmer, A. L., Michaels, M. G., Sánchez, P. J., Bernstein, D. I., ... Boppana, S. B. (2014). Detection of congenital cytomegalovirus infection by real-time polymerase chain reaction analysis of saliva or urine specimens. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(9), 1415–1418. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu263>
- Ross, S. A., Novak, Z., Pati, S., & Boppana, S. B. (2011). Diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infectious Disorders Drug Targets*, 11(5), 466–474. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21827433>
- Ryckman, B. J., Jarvis, M. A., Drummond, D. D., Nelson, J. A., & Johnson, D. C. (2006). Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *Journal of Virology*, 80(2), 710–722. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.2.710-722.2006>
- Sacher, T., Podlech, J., Mohr, C. A., Jordan, S., Ruzsics, Z., Reddehase, M. J., & Koszinowski, U. H. (2008). The Major Virus-Producing Cell Type during Murine Cytomegalovirus Infection, the Hepatocyte, Is Not the Source of Virus Dissemination in the Host. *Cell Host & Microbe*, 3(4), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.014>
- Sepkowitz, K. A. (2002). Opportunistic Infections in Patients with and Patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clinical Infectious Diseases*, 34(8), 1098–1107. <https://doi.org/10.1086/339548>
- Sester, M., Sester, U., Gärtner, B. C., Girndt, M., Meyerhans, A., & Köhler, H. (2002). Dominance of Virus-Specific CD8 T Cells in Human Primary Cytomegalovirus Infection. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(10), 2577–2584.

<https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000030141.41726.52>

- Sia, I. G., & Patel, R. (2000). New Strategies for Prevention and Therapy of Cytomegalovirus Infection and Disease in Solid-Organ Transplant Recipients. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), 83–121. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88935/pdf/cm000083.pdf>
- Sinclair, J., & Sissons, P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *Journal of General Virology*, 87(7), 1763–1779. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81891-0>
- Smith, R. M., Kosuri, S., & Kerry, J. A. (2014). Role of Human Cytomegalovirus Tegument Proteins in Virion Assembly. *Viruses*, 6(2), 582–605. <https://doi.org/10.3390/v6020582>
- Soetens, O., Vauloup-Fellous, C., Foulon, I., Dubreuil, P., De Saeger, B., Grangeot-Keros, L., & Naessens, A. (2008). Evaluation of different cytomegalovirus (CMV) DNA PCR protocols for analysis of dried blood spots from consecutive cases of neonates with congenital CMV infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3), 943–946. <https://doi.org/10.1128/JCM.01391-07>
- Soroceanu, L., Akhavan, A., & Cobbs, C. S. (2008). Platelet-derived growth factor- α receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature*, 455(7211), 391–395. <https://doi.org/10.1038/nature07209>
- Spector, S. A., Hsia, K., Crager, M., Pilcher, M., Cabral, S., & Stempien, M. J. (1999). Cytomegalovirus (CMV) DNA Load Is an Independent Predictor of CMV Disease and Survival in Advanced AIDS. *Journal of Virology*, 73(8), 7027–7030. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC112790/pdf/jv007027.pdf>
- Steininger, C., Puchhammer-Stöckl, E., & Popow-Kraupp, T. (2006). Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *Journal of Clinical Virology*, 37(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.03.005>
- Stowell, J. D., Forlin-Passoni, D., Din, E., Radford, K., Brown, D., White, A., ... Schmid, D. S. (2012). Cytomegalovirus survival on common environmental surfaces: opportunities for viral transmission. *The Journal of Infectious Diseases*, 205(2),

211–214. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir722>

- Swanson, E. C., & Schleiss, M. R. (2013). Congenital cytomegalovirus infection: new prospects for prevention and therapy. *Pediatric Clinics of North America*, 60(2), 335–349. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.12.008>
- Sylwester, A. W., Mitchell, B. L., Edgar, J. B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., ... Picker, L. J. (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus- specific CD4 % and CD8 % T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(5), 673–685. <https://doi.org/10.1084/jem.20050882>
- Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J. G. P., Borysiewicz, L. K., & Sinclair, J. H. (1991). Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of General Virology*, 72(9), 2059–2064. Disponível em <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/72/9/JV0720092059.pdf?expires=1505654023&id=id&accname=guest&checksum=513F276C8D5895512727A985A27A81D9>
- Tomtishen III, Jo. P. (2012). Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Annual Review of Biochemistry*, 9(22), 1–8. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>
- Torres-Madriz, G., & Boucher, H. W. (2008). Immunocompromised Hosts: Perspectives in the Treatment and Prophylaxis of Cytomegalovirus Disease in Solid-Organ Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 47(5), 702–711. <https://doi.org/10.1086/590934>
- Tortorella, D., Gewurz, B. E., Furman, M. H., Schust, D. J., & Ploegh, H. L. (2000). Viral subversion of the immune system. *Annual Review of Immunology*, 18(1), 861–926. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.861>
- Vamvakas, E. C. (2005). Is White Blood Cell Reduction Equivalent to Antibody Screening in Preventing Transmission of Cytomegalovirus by Transfusion? A Review of the Literature and Meta-Analysis. *Transfusion Medicine Reviews*, 19(3), 181–199. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2005.02.002>

- van de Berg, P. J. E. J., van Stijn, A., ten Berge, I. J. M., & van Lier, R. A. W. (2008). A fingerprint left by cytomegalovirus infection in the human T cell compartment. *Journal of Clinical Virology*, 41(3), 213–217. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.10.016>
- van der Bij, W., Schirm, J., Torensma, R., van Son, W. J., Tegzess, A. M., & The, T. H. (1988). Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(12), 2531–2535. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2852670>
- Varani, S., & Landini, M. P. (2011). Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. *Herpesviridae*, 2(6), 1–14. <https://doi.org/10.1186/2042-4280-2-6>
- Verbraak, F. D., Boom, R., Dillen, P. M. E. W. -v., van den Horn, G. J., Kijlstra, A., & de Smet, M. D. (1999). Influence of highly active antiretroviral therapy on the development of CMV disease in HIV positive patients at high risk for CMV disease. *British Journal of Ophthalmology*, 83(10), 1186–1189. <https://doi.org/10.1136/bjo.83.10.1186>
- Wang, D., Yu, Q.-C., Schröer, J., Murphy, E., & Shenk, T. (2007). Human cytomegalovirus uses two distinct pathways to enter retinal pigmented epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 20037–20042. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709704104>
- Wills, M. R., Poole, E., Lau, B., Krishna, B., & Sinclair, J. H. (2015). The immunology of human cytomegalovirus latency: could latent infection be cleared by novel immunotherapeutic strategies? *Cellular & Molecular Immunology*, 12(2), 128–38. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.75>
- Wreghitt, T. G., Teare, E. L., Sule, O., Devi, R., & Rice, P. (2003). Cytomegalovirus Infection in Immunocompetent Patients. *Clinical Infectious Diseases*, 37(12), 1603–1606. <https://doi.org/10.1086/379711>
- Zanghellini, F., Boppana, S. B., Emery, V. C., Griffiths, P. D., & Pass, R. F. (1999). Asymptomatic Primary Cytomegalovirus Infection: Virologic and Immunologic Features. *The Journal of Infectious Diseases*, 180(3), 702–707.

<https://doi.org/10.1086/314939>

Proposta de Artigo a submeter ao
Journal of Clinical Virology

3. Cytomegalovirus Infection: Comparison of methodologies for monitoring renal and cardiac transplants

3.1 Abstract

Cytomegalovirus remains a major cause of morbidity and mortality among solid organ transplant recipients, despite remarkable advances in its diagnosis, prevention and treatment. Currently two methodologies are used to monitor CMV infection and disease in these patients: pp65 antigenemia assay and quantitative nucleic acid test (QNAT). The propose of this study is to compare two different QNAT (one commercially available, Roche COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan CMV test and another laboratory-developed RT-PCR test) and one CMV pp65 antigenemia assay. A total of 49 samples from 32 transplant recipients (28 renal and 4 cardiac transplants) were submitted to these three methodologies. The results show a statistically significant agreement (concordance rates between 81,6 and 71,4% and Cohen's kappa coefficient values between 0,456 and 0,602 with a level of significance $< 0,001$) and a moderate to high significant ($P < 0,01$) correlation between these methods (Spearman's coefficient value of 0,769 for pp65 antigenemia and COBAS, 0,546 for pp65 antigenemia and RT-PCR "in house" and 0,736 for COBAS and RT-PCR "in house" comparison). The remarkable and unexpected results obtained by the antigenemia test reflects the decades of experience in this technique by the microbiology laboratory of Egas Moniz Hospital and the operator, since that the interpretation of this test is subjective and depends on the expertise of the person performing the test. Additionally, one third (33,3%) of all antigenemia positive samples have 1 or 2 positive cells. The results from this study show an agreement and a correlation between the three methodologies, therefore we conclude that these can be used successfully for after solid organ transplant recipients monitoring.

Keywords: Cytomegalovirus; transplant; antigenemia; QNAT.

3.2 Introduction

Human Cytomegalovirus (HCMV) is one of the largest known human viruses and a ubiquitous member of the *Herpesviridae* family (Ramanan & Razonable, 2013). Despite remarkable advances in its diagnosis, prevention and treatment, CMV remains a major cause of morbidity and mortality in hosts with impaired cellular immunity, like among solid organ transplant (SOT) recipients (Dioverti & Razonable, 2015).

Nowadays, there are many techniques available for detection of CMV, including serology, cell culture, histopathology, pp65 antigenemia and qualitative and quantitative nucleic acid test (NAT) (Razonable & Humar, 2013). However just two of them, because of their ability to assess viral load, are, currently, used to monitor the infection and disease caused by this virus, in transplant recipients: pp65 antigenemia and quantitative nucleic acid tests (QNAT) that targeting viral DNA (Kotton et al., 2013). Nevertheless, the first one has largely been replaced by the molecular methods, to follow-up these patients (Tan, Waggoner, & Pinsky, 2015).

The CMV pp65 antigenemia, was introduced in 1988 and during more than a decade was the most commonly used methodology for monitoring CMV infection in post-transplant recipients (Gerna, Percivalle, Torsellini, & Revello, 1998; Piiparinen, Höckerstedt, Lappalainen, Suni & Lautenschlager, 2002). This test is based on the detection of tegument phosphoprotein pp65 antigen by immunofluorescence or immunoenzymatic techniques (such as immunoperoxidase), in infected peripheral blood leukocytes. Given the fact that this is a qualitative and quantitative test, the results are reported either in positive/negative and in number of positive cells per total number of counted cells (Dioverti & Razonable, 2016; Razonable et al., 2002).

Antigenemia is used for establishing a diagnosis of CMV infection and disease (detection of positive result usually means an active CMV infection, and if added by compatible symptoms, confirms the diagnosis of CMV disease), a prognostic (there is a correlation between a higher count of positive cells and a greater severity disease or a larger risk of progression to CMV disease), a preemptive strategy (since antigenemia is capable of detecting CMV replication 5 to 14 days before the beginning of symptomatology, it is used to guide the initiation of preemptive therapies), monitoring response to antiviral therapy (the number of positive cells declines throughout effective antiviral treatment) and determine treatment endpoint (the therapy is suspended when a

negative result or an established threshold is achieved) (Kotton et al., 2013; Razonable & Hayden, 2013).

This is a rapid and easy to perform assay that does not require expensive equipment. In addition, in some studies, this method revealed an equal sensitivity as some in-house NATs, however in others this showed to be considerably less sensitive than some in-house NATs and Roche COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan CMV test. Other disadvantages include lack of assay standardization, subjective operator-dependent result interpretation, low specimen stability (due to these methods depending on the lifetime of *ex vivo* leukocytes) and low sensitivity in patients with severe leukopenia (< 1000 cells/ μ L) (Kotton et al., 2013; Kwon et al., 2015; Razonable & Hayden, 2013; Ross et al., 2011).

With regards to nucleic acid-based tests, this can amplify deoxyribonucleic acid (DNA) or ribonucleic acid (RNA), nevertheless the first one is a more sensitive method and does not experience low specimens' stability (RNA molecules are quickly degraded). This methodology is, typically, based on real time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technology due to its better accuracy, greater efficiency, faster response and lower risk of contamination when compared with conventional PCR. It can be performed in various clinical specimens, although peripheral blood sample is the most commonly used, due to the fact that all CMV infections cause viremia. Different blood compartments may be used, such as, whole blood (does not requires pretesting processing) leukocyte preparation, plasma and serum. There is no consensus as to which is the best blood sample for CMV NAT. Whole blood and leukocyte preparations are more sensitive, however these are more likely to detect latent nonreplicating virus. Some authorities proposed the use of whole blood samples (where higher viral load values are detect), whereas other authorities advocated the use of plasma or serum samples for CMV diagnosis and monitoring (Dioverti & Razonable, 2015; Razonable, Paya, & Smith, 2002).

NAT can be qualitative (reported as positive or negative result) or quantitative (reported as the amount of virus/ volume of specimen). Since qualitative NAT is not able to quantify viral loads, it has very limited clinical utility in monitoring transplanted patients. On the other hand, quantitative NAT can provide viral load quantification and therefore can be used to establish a rapid, high sensitive and specific diagnosis, a disease prognostic (there is a correlation between higher viral loads and more severe and

symptomatic disease), a preemptive therapy, monitoring response to antiviral therapy (viral load declines throughout of effective antiviral treatment) and determine treatment endpoint (the therapy is continued until the viral loads is undetectable or falls below a predefined threshold) (Dioverti & Razonable, 2015; Razonable & Hayden, 2013).

There are many QNAT available, some of them in-house laboratory-developed tests (LDTs). Each of these tests has unique assay characteristics, such as extraction methods, primers and targets, upper and lower limit of detection, precision, accuracy, specimen, calibration, and others. The biggest disadvantage of these LDTs is the great variability of results obtained among different laboratories which makes it impossible to create widely applicable thresholds for clinical indications. Considering this, in 2010, the World Health Organization (WHO) developed an international reference standard, composed by a titer of 5×10^6 IU/mL, with the aim of standardizing the results obtained interlaboratory. However, despite calibration with this standard, there are other variables involved that make LDTs provide discrepant results, such as sample type, operator depending variability, efficiency of target-specific amplification, assay biochemistries and nucleic extraction method efficiencies. That is why, it has been suggested that laboratories should consider using only commercial assays calibrated to the international standard, such as Roche COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan CMV test, and that all viral loads should be reported in IU/mL (Dioverti & Razonable, 2015; Fryer, Heath, & Minor, 2016; Hirsch et al., 2013; Razonable & Hayden, 2013).

3.3 Objective

The objective of this study is to compare two quantitative RT-PCR, one commercially available (Roche COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan CMV test) and another “in-house” RT-PCR (LDT by the microbiology department of Nova Medical School/Faculdade de Ciências Médicas), and one CMV pp65 antigenemia assay.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Patients and clinical specimens

A total of 49 specimens from 32 transplant recipients (28 renal and 4 cardiac transplant, 16 male and 16 female), with ages ranging from 20 to 71 years of age (mean of 51,9 years), were collected in Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, from May 2016 to

January 2017. All samples were submitted to two quantitative CMV RT-PCR (Roche COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan CMV test and an in house CMV RT-PCR) and one CMV pp65 antigenemia assay. The tests were done only once in 21 patients and repeatedly done in 11 patients (Anexo I).

3.4.2 Quantitative CMV RT-PCR commercially available

COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan CMV test, is an *in vitro* quantitative nucleic acid amplification test to quantify CMV DNA in EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) human plasma. This test permits automated specimen preparation, using the COBAS AmpliPrep instrument, followed by RT-PCR automated amplification and detection of CMV DNA, using the COBAS TaqMan 48 analyzer. The whole process was run according to the manufacturer's instructions.

During the specimen preparation phase, 350 μ L, from the initial in-put of 500 μ L of EDTA-plasma sample, are processed by COBAS AmpliPrep instrument. Initially, a protease, a known number of CMV Quantitative Standard (QS) DNA molecules, the lysis reagent and magnetic glass particles are added to each sample. CMV QS is a noninfectious DNA that has similar primer binding regions as CMV specimen DNA, but has a unique probe binding site. It is added to compensate the inhibition effects and control the process (specimen preparation and amplification), leading to a better accuracy of quantification CMV DNA process. CMV particles are lysed (by incubation at elevated temperature with a protease) and then CMV specimen DNA and CMV QS DNA are bound to the surface of the magnetic glass particles. The processed sample is added to the amplification mixture (that includes, among others, Z05 DNA polymerase, magnesium, deoxynucleotide triphosphates [dNTP], specific primers to amplify the region of the CMV DNA polymerase [UL54] gene, oligonucleotide probes specific for the CMV and the CMV QS, labeled with different fluorochromes, allowing simultaneous and separated identification) and transferred to COBAS TaqMan 48 analyzer, where the RT-PCR amplification reaction takes place. Simultaneously, the same process is used for high positive, low positive and negative controls. After all these steps, the information is sent and processed by AMPLILINK software, which reports the titer results of specimens and controls in IU/mL.

3.4.3 Quantitative CMV RT-PCR “in-house”

The quantitative CMV RT-PCR “in-house” was laboratory-developed by the microbiology department of Nova Medical School/Faculdade de Ciências Médicas. The CMV target for this test is the gene responsible for phosphoprotein pp65 codification, UL83. CMV DNA was extracted from 200 µL whole blood, using “JetQuick Genomic DNA Purification Kits” commercial kit and according to the manufacturer's instructions.

The RT-PCR mixture, with a final volume of 25 µL, contained 5 µL of DNA sample and 20 µL of the following reagents mix:

- 1 µL of forward primer (100 µM): 5' – CCC TCC GGC AAG CTC TTT – 3'
- 1 µL of reverse primer (100 µM): 5' – CAG GTC CTC TTC CAC GTC AGA – 3'
- 0,75 µL of TaqMan probe (10 µM): 5' – TGC ACG TCA CGC TGG – 3' labeled at 5'end with 6-carboxy-fluorescein as the reporter fluorescent dye and at 3'end with minor groove binding (MGB) as the non-fluorescent quencher.
- 12,5 µL of amplification mixture (2×)
- Ultrapure water to 20 µL

The equipment used to perform the RT-PCR was the ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), with an amplification cycle of: 1 cycle of 95°C for 10 min followed by 50 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1min. Positive and negative controls were included into the process in duplicate, such as the samples. A standard curve was established from a serial four-fold 1:10 dilution of an AD-169 strain suspension, which was quantified by a commercial test (Artus CMV RG PCR kit, Rotor-Gene 3000, Corbett Research). It was also used as an internal control in each sample (2 µL of a dilution of AD-169 strain suspension).

The Ct values obtained were then used to deduce the viral load values using the standard curve. The final result of each specimen and control, was achieved from the mean of the respective two viral load values obtained, reported as copies/mL.

3.4.4 CMV pp65 antigenemia assay

The antigenemia assay was preformed using CINA kit system (Argene Biosoft). This is a process that allows phosphoprotein pp65 antigen detection in a leukocyte preparation by indirect immunofluorescence.

To achieve this, the leukocytes were initially isolated from a sample of 1-3 mL of EDTA peripheral blood (process that implicate the use of centrifugation technic, dextran, collection of buffy coat fraction and Red Blood Cell Lysis Solution) followed by microscope slide preparation with 200 μ L of the leukocyte suspension, using cytocentrifugation. Secondly, the cells were fixed using a fixate solution. Immediately before the immunostaining, there is a process of cell membrane permeabilization with permeabilization solution. Lastly, a monoclonal antibody directed against the protein pp65 and then a secondary antibody labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) was added to the preparation. After these steps, the microscope slides are observed under epifluorescence microscope, and the results are reported as negative (fluorescent leukocyte nuclei are not observed) or positive (at least 1 fluorescent leukocyte nucleus is visualized) and number of positive cells/200 000 leukocytes. During this process, a positive control microscope slide with CMV-infected human fibroblasts is used.

3.4.5 Statistical analysis

The association between methodologies (as a positive or a negative result) was analysed using Cross-tabulation, Chi-square and Fisher exacts tests. The agreement between monitoring methods (as a positive or a negative result) was assessed by Cohen's kappa coefficient and the interpretation of the values were based on Landis and Koch guideline (Landis & Koch, 1977): < 0.00 poor agreement, 0.00-0.20 slight agreement, 0.21-0.40 fair agreement, 0.41-0.60 moderate agreement, 0.61-0.80 substantial agreement and 0.81-1.00 almost perfect agreement. The correlation between assays was measured using the Spearman's correlation coefficient and linear regression, after logarithmic transformation. The correlation coefficient was interpreted as follows (Mukaka, 2012): 0 as no correlation, -1 as perfect negative correlation, +1 as perfect positive correlation, 0 to 0,3 (0 to -0,3) as negligible correlation, 0,3 to 0,5 (-0,3 to -0,5) as low positive (negative) correlation, 0,5 to 0,7 (-0,5 to -0,7) as moderate positive (negative) correlation, 0,7 to 0,9 (-0,7 to -0,9) as high positive (negative) correlation and 0,9 to 1 (-0,9 to -1) as

very high positive (negative) correlation. IBM SPSS Statistics Version 24 were used to analyse the data.

3.5 Results

3.5.1 Qualitative results of the CMV pp65 antigenemia assay vs. CMV RT-PCR commercially available assay

For this qualitative analysis, all results were transformed to a positive or negative value, *i.e.* for pp65 antigenemia assay all cell counts lower than 1 were considered as negative and cell counts higher than or equal as 1 were reported as positive, for COBAS test all viral load below 137 IU/mL (limit of detection) were considered negative and above or equal as 137 IU/mL were reported as positive.

The association between the pp65 antigenemia assay and COBAS test was confirmed for a significance of 0,1%, and therefore these monitoring methods are not independent.

The agreement between these two assays is moderate, with a Cohen's kappa coefficient value of 0,456 and a significance value $< 0,001$. In a total of 49 samples, 33 were positive for pp65 antigenemia assay and 21 were positive for COBAS test, amount these, 20 were simultaneously positive in the two assays (Table 1). In opposition, a total of 15 samples were simultaneously negative for these two methods (Table 1). Therefore concordance was observed in 35 (71,4%) samples. Amount all discordant samples, 13 were pp65 antigenemia assay positive (the number of pp65 positive cells were between 1 and 7 [mean= 2,08 cells] and 10 of these samples have 1 or 2 positive cells) and COBAS test negative (10 of these were not undetectable, but below 137 IU/mL, and just 3 were undetectable). Additionally, 1 sample was pp65 antigenemia assay negative and COBAS test positive (141 IU/mL).

Table 1 Comparison between pp65 antigenemia assay and COBAS test.

		COBAS test		Total
		Negative	Positive	
pp65 antigenemia assay	Negative	15 (30,6%)	1 (2,0%)	16 (32,7%)
	Positive	13 (26,5%)	20 (40,8%)	33 (67,3%)
Total		28 (57,1%)	21 (42,9%)	49 (100%)

3.5.2 Qualitative results of the CMV pp65 antigenemia vs. CMV RT-PCR “in-house” assays

In order to make a qualitative analysis, it was necessary to transform all results in positive or negative values, to achieve this, all cell counts below 1 in pp65 antigenemia assay were considered as negatives and if this count were higher than or equal to 1 they were reported as positives. Likewise, all RT-PCR “in-house” viral loads lower than 150 cp/mL (limit of detection) were considered negatives and if viral loads were higher or equal to this limit were reported as positives.

The association between pp65 antigenemia assay and RT-PCR “in-house” method was tested and confirmed, with a significance value $< 0,001$, thus these two methodologies are not independent.

The agreement between the two assays is moderate, since the Cohen’s kappa coefficient value is 0,602 with a significance value $< 0,001$. Out of a total of 49 samples, 33 and 30 were positive for pp65 antigenemia assay and RT-PCR “in-house” method, respectively (Table 2). Of these, 27 samples were positive for the two assays simultaneously (Table 2). In contrast, 13 samples were mutually negatives for the two methods (Table 2). Therefore concordance was observed in 40 (81,6%) samples. Among those who were discrepant, 6 were pp65 antigenemia assay positive (with a number of positive cell between 1 and 3 [mean= 1,67 cells] and 5 of these samples have 1 or 2 positive cells) and RT-PCR “in-house” method negative (5 of these were below 150 cp/mL and just 1 was undetectable). Furthermore, 3 samples were pp65 antigenemia assay negative and RT-PCR “in-house” method positive (with a viral load below 979 cp/mL [mean= 570,67 cp/mL]).

Table 2 Comparison between pp65 antigenemia assay and RT-PCR “in house” method.

		RT-PCR “in-house” method		Total
		Negative	Positive	
pp65 antigenemia assay	Negative	13 (26,5%)	3 (6,1%)	16 (32,7%)
	Positive	6 (12,2%)	27 (55,1%)	33 (67,3%)
Total		19 (38,8%)	30 (61,2%)	49 (100%)

3.5.3 Qualitative results of the CMV RT-PCR commercially available vs. CMV RT-PCR “in-house” assays

Once more, for this qualitative analysis all results were transformed to a positive or negative value *i.e.* for COBAS test all viral load below 137 IU/mL (limit of detection) were considered negative and above or equal as 137 IU/mL were reported as positive, whereas all RT-PCR “in-house” method viral loads lower then 150 cp/mL (limit of detection) were considered negatives and if viral loads were higher or equal as this limit they were reported as positives.

Association tests confirmed that COBAS test and RT-PCR “in-house” assays were not independent, with a significance < 0,001.

Since Cohen’s kappa coefficient value is 0,565 (with a significant level of 0,1%), the agreement between these two methodologies is moderate. Concerning all 49 samples, 21 and 30 were positive for COBAS test and RT-PCR “in-house” method, respectively (Table 3). Of these, 20 were positive for the two techniques at the same time (Table 3). A total of 18 samples were, simultaneously, negative for the two assays (Table 3). Therefore concordance was observed in 38 (77,5%) samples. One of the discordant results was positive for COBAS test (154 IU/mL) and negative for RT-PCR “in-house” method (were not undetectable, but below 150 cp/mL). Moreover, 10 of those ones discrepant, were COBAS test negative (all of them were not undetectable, but below 137 IU/mL) and RT-PCR “in-house” method positive (with a viral load between 150 and 1424 cp/mL [mean= 597,3 cp/mL]).

Table 3 Comparison between COBAS test and RT-PCR “in house” method.

		RT-PCR “in-house” method		Total
		Negative	Positive	
COBAS test	Negative	18 (36,7%)	10 (20,4%)	28 (57,1%)
	Positive	1 (2,0%)	20 (40,8%)	21 (42,9%)
Total		19 (38,8%)	30 (61,2%)	49 (100%)

3.5.4 Quantitative results of the CMV pp65 antigenemia assay vs. CMV RT-PCR commercially available assays

In order to compare pp65 antigenemia assay and COBAS test, all samples were logarithmized. As considered by Piiparinen, Höckerstedt, Grönhagen-riska & Lautenschlager (2004), all COBAS viral load values not undetectable and under the limit of detection were considered as 137 IU/mL.

The correlation between pp65 antigenemia assay and COBAS test was statistically significant ($P < 0,01$), with a high positive correlation (Spearman’s coefficient value of 0,769 and $R^2 = 0,595$) for all 30 samples considered.

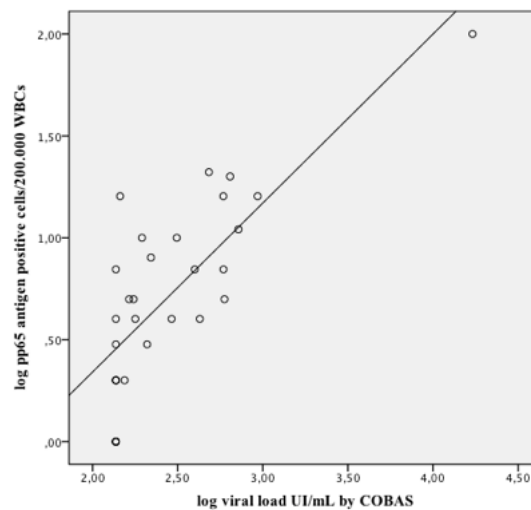


Figure 1 Correlation between pp65 antigenemia assay and COBAS test in 30 samples. The linear regression is showed in solid line.

3.5.5 Quantitative results of the CMV pp65 antigenemia assay vs. CMV RT-PCR “in-house” assays

The comparison of pp65 antigenemia assay and RT-PCR “in-house” method was done after all samples were logarithmized. As considered by Piiparinen et al. (2004), those RT-PCR “in house” method viral loads values not undetectable and under the limit of detection were considered as 150 cp/mL.

CMV pp65 antigenemia assay and RT-PCR “in-house” method correlation was moderately positive (Spearman’s coefficient value of 0,546 and $R^2 = 0,435$) and statistically significant ($P < 0,01$), for all 32 samples considered.

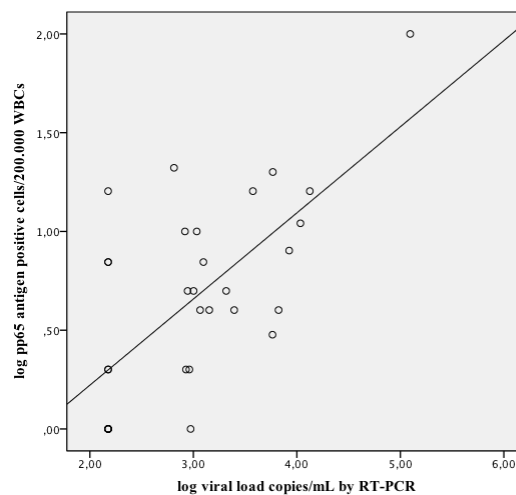


Figure 2 Correlation between pp65 antigenemia assay and RT-PCR “in house” method in 32 samples. The linear regression is showed in solid line.

3.5.6 Quantitative results of the CMV RT-PCR commercially available vs. CMV RT-PCR “in-house” assays

All samples were logarithmized to compared COBAS test and RT-PCR “in-house” method. As considered by Piiparinen et al. (2004), all COBAS test viral load values not undetectable and under the limit of detection were considered as 137 IU/mL and all RT-PCR “in house” method viral loads values not undetectable and under the limit of detection were considered as 150 cp/mL.

COBAS test and RT-PCR “in-house” method were highly positive correlated (Spearman’s coefficient value of 0,736 and $R^2 = 0,551$) with a significant level $< 0,01$, for all 40 samples considered.

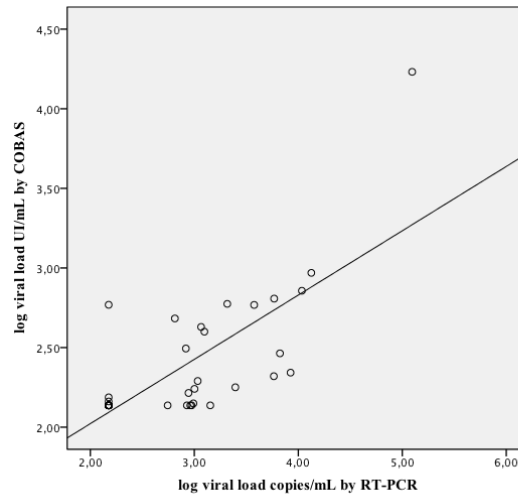


Figure 3 Correlation between COBAS test and RT-PCR method in 40 samples. The linear regression is showed in solid line.

3.6 Discussion and Conclusion

Currently, two methodologies are used to monitor post-transplant patients: pp65 antigenemia and quantitative nucleic acid tests. There are a variety of different studies comparing these two methods.

The objective of this study was to compare 2 different QNAT (one commercially available and other laboratory-developed) and a pp65 antigenemia assay.

This study revealed a good agreement between all methods, with concordance rates between 81,6 and 71,4% and Cohen’s kappa coefficient value between 0,456 and 0,602 ($P < 0,001$). The majority of discrepant samples were similar: when antigenemia is positive and COBAS or RT-PCR “in house” is negative, the number of positive cell count were low (means were 2,08 and 1,67, respectively) and viral loads were, in almost every case, not undetectable but under the detection limit. In the opposite case, viral load was low (141 IU/mL) in COBAS assay and slightly higher (mean =570,67 cp/mL) in RT-PCR. Likewise, when COBAS assay was positive (154 IU/mL) and RT-PCR was negative, the latter returns not undetectable values (<150 cp/mL). Conversely, when RT-

PCR is positive (mean = 597,3 cp/mL) and COBAS is negative, the latter returns, as well, not undetectable values (137 IU/mL).

The remarkable and unexpected results obtained by the antigenemia test reflects the decades of experience in this technique by the microbiology laboratory of Egas Moniz Hospital and the operator, since that the interpretation of this test is subjective and depends on the expertise of the person performing the test. Additionally, one third (33,3%) of all antigenemia positive samples have 1 or 2 cells.

This study also shown that exists significant ($P < 0,01$) correlation between these methodologies, which is verified by the high Spearman's coefficient value in antigenemia/COBAS and COBAS/RT-PCR "in house" ($\rho = 0,769$ $R^2 = 0,595$ and $\rho = 0,736$ $R^2 = 0,551$, respectively) and moderate value in antigenemia/RT-PCR "in house" ($\rho = 0,546$ $R^2 = 0,435$) statistical analysis.

However, there are others preponderant factors involved, that should be analyzed when comparing these methodologies, such as, automation of the methods (much more developed in the COBAS assay), stability of the specimens (higher in QNAT methods), the costs involved (higher in RT-PCR technologies and even greater in the COBAS test), volume of the specimens (lower in QNAT), turn-around time of the method (faster in COBAS test), sensibility and specificity of the method (high in these methodologies, however QNATs are considered the most sensitive methods for CMV detection), standardization (COBAS test demonstrated co-linearity to the first International Standard developed by the WHO), and others (Dioverti & Razonable, 2015; Razonable & Hayden, 2013).

For all these reasons, quantitative nucleic acid tests become the most commonly performed tests for monitoring CMV infection and disease after transplant, and particularly, the commercial available assays calibrated to the international standard (such as Roche COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan CMV test) are, currently, being suggested for the care of these patients (Razonable & Hayden, 2013).

The results from this study show an agreement and a correlation between the three methodologies, therefore we conclude that these can be used successfully for after solid organ transplant recipients monitoring.

3.7 Acknowledgements

We would like to thank the staff from microbiology laboratory, at the Egas Moniz Hospital, and the members of the microbiology department, at the Nova Medical School/Faculdade de Ciências Médicas, for collecting the data. Also, we would like to thank Professor Alexandra Figueiredo and Doctor Ana Paula Silva for assistance with statistical analysis.

3.8 References

- Dioverti, M. V., & Razonable, R. R. (2016). Cytomegalovirus. *Microbiology Spectrum*, 4(4), 1–26. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0022-2015>
- Dioverti, M. V., & Razonable, R. R. (2015). Clinical utility of cytomegalovirus viral load in solid organ transplant recipients. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 28(4), 317–322. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000173>
- Fryer, J. F., Heath, A. B., & Minor, P. D. (2016). A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus for nucleic acid amplification technology. *Biologicals*, 44(4), 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.04.005>
- Gerna, G., Percivalle, E., Torsellini, M., & Revello, M. G. (1998). Standardization of the human cytomegalovirus antigenemia assay by means of in vitro-generated pp65-positive peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(12), 3585–3589. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9817877>
- Hirsch, H. H., Lautenschlager, I., Pinsky, B. A., Cardenoso, L., Aslam, S., Cobb, B., ... Valsamakis, A. (2013). An International Multicenter Performance Analysis of Cytomegalovirus Load Tests. *Clinical Infectious Diseases*, 56(3), 367–373. <https://doi.org/10.1093/cid/cis900>
- Kotton, C. N., Kumar, D., Caliendo, A. M., Asberg, A., Chou, S., Danziger-Isakov, L., & Humar, A. (2013). Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation Journal*, 96(4), 333–360. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31829df29d>

- Kwon, S., Jung, B. K., Ko, S. Y., Lee, C. K., & Cho, Y. (2015). Comparison of quantitation of cytomegalovirus DNA by real-time PCR in whole blood with the cytomegalovirus antigenemia assay. *Annals of Laboratory Medicine*, 35(1), 99–104. <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.1.99>
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Source: Biometrics*, 33(1), 159–174. Disponível em <http://www.jstor.org/stable/2529310>
- Mukaka, M. M. (2012). Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal*, 24(3), 69–71. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638278>
- Piiparinen, H., Höckerstedt, K., Grönhagen-riska, C., & Lautenschlager, I. (2004). Comparison of two quantitative CMV PCR tests , Cobas Amplicor CMV Monitor and TaqMan assay , and pp65-antigenemia assay in the determination of viral loads from peripheral blood of organ transplant patients. *Journal of Clinical Virology*, 30(3), 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2003.12.010>
- Piiparinen, H., Höckerstedt, K., Lappalainen, M., Suni, J., & Lautenschlager, I. (2002). Monitoring of viral load by quantitative plasma PCR during active cytomegalovirus infection of individual liver transplant patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 2945–2952. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2945-2952.2002>
- Ramanan, P., & Razonable, R. R. (2013). Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation: a review. *Infection & Chemotherapy*, 45(3), 260–271. <https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.3.260>
- Razonable, R. R., & Hayden, R. T. (2013). Clinical utility of viral load in management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 703–727. <https://doi.org/10.1128/CMR.00015-13>
- Razonable, R. R., & Humar, A. (2013). Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 13(s4), 93–106. <https://doi.org/10.1111/ajt.12103>
- Razonable, R. R., Paya, C. V., & Smith, T. F. (2002). Role of the laboratory in diagnosis

and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), 746–752. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.3.746-752.2002>

Ross, S. A., Novak, Z., Pati, S., & Boppana, S. B. (2011). Diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infectious Disorders Drug Targets*, 11(5), 466–474. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21827433>

Tan, S. K., Waggoner, J. J., & Pinsky, B. A. (2015). Cytomegalovirus load at treatment initiation is predictive of time to resolution of viremia and duration of therapy in hematopoietic cell transplant recipients. *Journal of Clinical Virology*, 69, 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.06.006>

4. Anexos

Anexo I – Resultados obtidos nas 3 técnicas (Teste de Antigenemia, Teste COBAS e Teste RT-PCR “in house”) por doente.

Doente	Idade (anos)	Tipo de Transplante	Data de colheita	Teste de Antigenemia (células positivas/200 000 leucócitos)	Teste COBAS (IU/mL)	Teste RT-PCR “in house” (n° de cópias/mL)
1	56	Transplante Renal	11/05/16	2	<137	914
2	41	Transplante Renal	18/05/16	2	<137	848
3	69	Transplante Renal	24/05/16	10	312	829
4	71	Transplante Renal	27/05/16	7	398	1250
5	48	Transplante Renal	27/05/16	0	Indetetável	Indetetável
6	49	Transplante Renal	06-06-2016	0	Indetetável	<150
3	69	Transplante Renal	07-06-2016	1	indetetável	<150
7	66	Transplante Renal	08-06-2016	2	<137	<150
8	41	Transplante Renal	08/06/16	7	<137	400
8	41	Transplante Renal	16/06/16	21	482	650
8	41	Transplante Renal	22/06/16	16	145	165
9	20	Transplante Renal	29-06-2016	1	Indetetável	<150
10	46	Transplante Renal	06-07-2016	5	595	2074

11	62	Transplante Renal	19-07-2016	5	174	1004
12	39	Transplante Renal	19-07-2016	1	Indetetável	<150
13	60	Transplante Renal	25/07/16	0	indetetável	Indetetável
14	50	Transplante Renal	01-08-2016	0	<137	<150
11	62	Transplante Renal	02-08-2016	16	586	3760
15	65	Transplante Renal	09/08/16	0	Indetetável	Indetetável
16	65	Transplante Renal	17-08-2016	0	<137	<150
5	48	Transplante Renal	25-08-2016	0	Indetetável	Indetetável
17	58	Transplante Renal	31-08-2016	0	<137	<150
18	50	Transplante Renal	27-09-2016	1	<137	400
19	60	Transplante Cardíaco	03-10-2016	1	<137	150
20	58	Transplante Renal	06-10-2016	0	<137	<150
19	60	Transplante Cardíaco	07-10-2016	2	154	<150
21	48	Transplante Renal	14-10-2016	1	<137	941
12	39	Transplante Renal	18-10-2016	0	<137	<150

22	63	Transplante Renal	08-11-2016	0	<137	554
23	53	Transplante Renal	31-10-2016	0	<137	<150
19	60	Transplante Cardíaco	31-10-2016	0	<137	179
23	53	Transplante Renal	25-10-2016	0	<137	<150
22	63	Transplante Renal	15-11-2016	4	426	1163
24	34	Transplante Renal	15-11-2016	1	<137	163
25	53	Transplante Cardíaco	05-12-2016	3	<137	Indetetável
7	66	Transplante Renal	13-12-2016	0	141	979
26	34	Transplante Renal	14-12-2016	0	<137	<150
27	45	Transplante Cardíaco	28-12-2016	4	<137	1424
28	59	Transplante Renal	28-12-2016	8	220	8425
19	60	Transplante Cardíaco	27-12-2016	100	17052	124334
27	45	Transplante Cardíaco	04-01-2017	7	587	261
7	66	Transplante Renal	12-01-2017	5	164	880
29	40	Transplante Cardíaco	15-12-2016	20	642	5855

28	59	Transplante Renal	21-12-2016	16	932	13347
30	35	Transplante Renal	16-01-2017	10	195	1078
31	58	Transplante Renal	18-01-2017	4	178	2481
32	64	Transplante Renal	27-01-2017	11	719	10813
28	59	Transplante Renal	04-01-2017	3	209	5811
28	59	Transplante Renal	12-12-2016	4	291	6654